

**Die biologischen Grundlagen
der Knochentransplantation, untersucht
an auto-, homoio- und heterologen
Transplantaten**

Fritz Mutzek

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548301_0056

**Die biologischen Grundlagen
der Knochentransplantation, untersucht
an auto-, homoio- und heterologen
Transplantaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Fritz Mutzek
aus Fulda

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. HAMELMANN

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. ZENKER

Dekan: Prof. Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 6. 1964



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. THEORETISCHER TEIL 8

A. EINLEITUNG 8

Die geschichtliche Entwicklung der Knochentransplantation 8

Osteoblastenlehre 9

Induktionslehre 13

1. Theorie der chemischen Diffusion 17

2. Theorie des Zellkontakts 17

3. Theorie vom Zellkontakt und interzellularer
Materialübertragung 18

4. Theorie der "matrix-interaction" 18

Leitschientheorie 19

B. ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DES KNOCHENS 20

I. Die chemische Struktur des Knochens 20

1. Matrix 20

a) Kollagen 20

Theorien der Kollagenbildung 22

1. Cytologische Faktoren 22

2. Chemische Faktoren 22

3. Enzyme 23

b) Grundsubstanz 23

Chemie 23

2. Zellen 24

c) Osteoblasten 24

Größe, Form, Fortsätze 24/25

Chemie; Färbbarkeit 25/26

Glykogen

Phosphatase

Zusammenfassung 26

Herkunft 26

Funktion 27

d) Die Osteoclasten	27
Größe, Kern, Cytoplasma, Bürstensaum	27
Begriff der Pinocytose	28
Elektronenmikroskopische Studien von HANCOX	28
a. Knochenveränderungen	28
b. Übergangszone	29
c. Cytoplasma	29
3. Hydroxyapatitähnliche Mikrokristalle	30
1. Tafelform nach ROBINSON und WATSON	30
2. Sechseckige Prismenform nach FINEAN und ENGSTRÖM	30
3. Honigwabenform nach ASCENZI	30
II. Der Stoffwechsel des Knochens	31
Das Serumcalcium	32
Das Serumphosphat	33
1. Oberflächenchemie	33
2. Der Verkalkungsprozeß	36
2a. DIE NUKLEATIONSTHEORIE	36
Die 4 Gleichgewichtsarten	36
Über die Kristall-induzierende Eigenschaft des Kollagens	38
2b. DIE PHOSPHATASETHEORIE	39
Fermenttheorie von ROBISON	39
2c. ANDERE EINFLÜSSE AUF DEN VERKAL- KUNGSVORGANG	39
III. Allergie und Transplantation	40
II. EXPERIMENTELLER TEIL	45
Problemstellung	45
Versuchsbeschreibung	45
Histologische Befunde	47
1) 8 Tage nach der Transplantation	47

a. Frische Autoplastik	47
b. Tiefgekühlte Homoioplastik	48
c. Heteroplastische Spanverpflanzung	53
2) 16 Tage nach der Transplantation	56
3) 3 Wochen nach der Transplantation	57
4) 6 Wochen nach der Transplantation	58
5) 3 Monate nach der Transplantation	59
6) 4 1/2 Monate nach der Transplantation	59
7) 6 Monate nach der Transplantation	60
Histologische Befunde nach zweizeitiger Transplantation auto-, homoio- und heteroplastischer Späne	60
a. Autoplastik	60
b. Heteroplastik	61
c. Homoioplastik	61
Zusammenfassung	62
DISKUSSION	62
I. Der Einheilungsverlauf	62
II. Die biologische Wertigkeit	63
III. Funktion des Transplantates	64
ZUSAMMENFASSUNG	68
LITERATURVERZEICHNIS	69
Lebenslauf	80

I. THEORETISCHER TEIL

A. EINLEITUNG

Die geschichtliche Entwicklung der Knochentransplantation

"Nur der kann wahrer Bildner am lebenden Organismus sein, welcher den ewigen Gesetzen vom Werden und Vergehen der Natur nahe ist", sagte REHN 1936 in seinem Vortrag anläßlich der 60. Tagung der Dtsch. Ges. f. Chirurgie (zit. aus BÜRKLE DE LA CAMP, 1960).

Dieser ständige Wechsel vom "Werden und Vergehen" spielt sich deutlich bei der Knochentransplantation ab. Während das Transplantat abstirbt und resorbiert wird, vollzieht sich gleichzeitig die Knochenneubildung. Trotz des Fortschrittes der Medizin in den vergangenen Jahrzehnten sind auf dem Gebiete der Knochenverpflanzung keineswegs alle Probleme gelöst. Zwei wichtige Fragen werden immer noch diskutiert: Woher stammt der neugebildete Knochen? Wie entsteht er? Die entscheidenden Vorgänge der Osteogenese und die Grundlagen des Transplantateinbaus sind weitgehend unbekannt. Im wesentlichen bestehen heute drei Theorien:

- 1.) die Osteoblastenlehre
- 2.) die Induktionslehre und
- 3.) die Leitschienentheorie

Es ist von Interesse, ihrer geschichtlichen Entwicklung nachzugehen. Die Versuche, Knochendefekte durch freie Verpflanzung von Knochenstücken zur Ausheilung zu bringen, reichen bis zum Beginn des vorigen Jahrhunderts zurück, wenn auch vereinzelt schon früher derartige Operationen am Menschen vorgenommen worden sind, wie die von JOB A MEEKREN 1682 überlieferte Heilung eines Schädeldefektes nach Säbelhieb durch Einlagerung eines Schädelstückes vom Hund (LEXER, 1924).

Die ersten erfolgreichen autoplastischen Verpflanzungen werden von MERREM 1809, von v. WALTHER 1821 und von HEINE 1936 berichtet, denen es in einigen Fällen an Tieren gelang, die subperiostal entnommenen Trepanationsscheiben wieder einzuheilen.

FLOURENS verpflanzte 1847 homoioplastische, periostgedeckte Späne und folgte aus seinen Ergebnissen, daß der Knochenhaut eine knochenbildende Bedeutung zukäme.

Aber auch die Heteroplastik ergab klinische Erfolge. MAC EWEN verpflanzte 1874 ein Stück aus dem Scheitelbein eines jungen Hundes in einen menschlichen Schädeldefekt und erreichte die Einheilung des subperiostal eingelagerten Transplantats. Ähnliche erfolgreiche, heteroplastische Versuche führte JAKSCH

1889 mit dem Schädelknochen einer jungen Gans, RICARD 1891 mit dem Hüftbein eines jungen Hundes aus (zit. bei LEXER, 1924). OLLIER (1867) verglich die Einheilung auto-, homoio- und heteroplastischer Implantate und kam zu dem Ergebnis, daß die Homoioplastik bessere Einheilungsaussichten habe als die Heteroplastik. Die Erhaltung der Vitalität eines Spans sei von artspezifischen Gefäßen und von der Gewebsflüssigkeit abhängig. Mit dieser Auffassung kam er der heutigen Ansicht von der Bedeutung des biologischen Unterschieds zwischen der Homoio- und Heteroplastik sehr nahe. Physiologische Ernährungsbedingungen, welche dem Transplantat sogar ein Weiterleben ermöglichen sollen, sieht OLLIER nur in der Autoplastik gegeben. Er überprüfte in 68 Tierversuchen die Resultate von FLOURENS und beobachtete bei Transplantation von Periost in die Muskulatur Knochenneubildung. Die mitverpflanzte Knochenhaut stellt die Voraussetzung für die Lebenserhaltung des Transplantats dar. Jedes andere Knochenstück stirbt ab, fällt der Resorption oder der bindegewebigen Einscheidung anheim. Nach OLLIER sind die Kriterien für die lebendige Einheilung eines Spans seine Durchwachsung mit Gefäßen und sein Dickenwachstum, welches durch periostale Apposition vor sich geht. Aus seinen Versuchsergebnissen - nämlich, daß bei frischen, auto- und homoioplastischen samt Periost verpflanzten Transplantaten die Einheilung voranschritt, dagegen bei periostlosen, frischen und toten Spänen nach Transplantation in ein knöchernes Lager die Resorption überwog - schloß OLLIER, daß die Knochenhaut die Verbindung mit der Nachbarschaft einleite, die Gefäßversorgung vermittele und die Knochenneubildung unterhalte (zit. bei LENTZ, 1955; BAUERMEISTER, 1958). SEDILLOT (1870) konnte im Gegensatz zu OLLIER in seinen Versuchen zeigen, daß Periost ohne dazugehörigen Knochen nicht osteogenetisch wirksam sei. Von diesen umfassenden Forschungen über die Regenerationsfähigkeit des Periosts nimmt die Osteoblasten-Lehre ihren wissenschaftlichen Ausgang. Ihre Vertreter sind der Ansicht, daß sich neuer Knochen nur aus präexistenten, knochenbildungsfähigen Zellen des Transplantatperiosts formen kann, dessen Mitverpflanzen zur guten Einheilung erforderlich ist.

RADZIMOWSKY erkannte, daß alle Zellen des Transplantats absterben. Die Einheilung eines Knochenstückes ist nicht unbedingt ein Beweis für seine erhaltene Lebenskraft. Zunächst aber sprachen klinische Erfolge noch zu Gunsten der Lehre OLLIERs. SEYDEL deckte 1889 einen Schädeldefekt mit periosthaltiger Corticalis aus der Tibia, v. BRAMANN ersetzte einen Humerusdefekt mit Hilfe eines periostgedeckten Tibiaspans von 6 cm Länge, 3 cm Breite und 2 cm Dicke (zit. bei LEXER, 1924). Diese guten klinischen Ergebnisse fanden jedoch keine Nachahmung, da sie gerade in die Zeit der Veröffentlichung der BARTHschen Arbeiten (1893) fielen. BARTH widmete sich der Beantwortung der Frage, ob die Lebensfähigkeit der einzelnen Gewebsbestandteile eines Spans erhalten bleibt

und auf welche Weise sich der Ersatz zugrundegehender Teile vollzieht. BARTH entnahm subperiostal ein Stück des Schädeldaches und replantierte diese Knochenscheibe unter das Periost. Trotz dieser günstigen Bedingungen und der klinischen Einheilung der Scheiben ergab die mikroskopische Untersuchung nicht den naheliegenden Schluß, daß die Transplantate unter Erhaltung des Lebens eingehilt waren (BARTH, 1893; 1895). Das transplantierte Gewebe ist an dem Ersatz nicht aktiv beteiligt, sondern stirbt samt Periost und Mark zum größten Teil ab. Der Ersatz durch neues Knochengewebe vollzieht sich bei der Auto-, Homoio- und Heteroplastik auf dieselbe Weise. Die Verpflanzung entkalkten Knochens in ein knöchernes Lager führte zunächst zu einer ausgiebigen Resorption durch einwachsendes Granulationsgewebe und erst dann zur Callusbildung. BARTH vermutete, daß die Substitution vom Lager ausgehe unter "schleichendem Ersatz", der bei lebendem oder totem Knochen an die Kalksalze gebunden sei, welche für den Aufbau des neuen Knochens unmittelbar verwendet werden und somit zur rascheren Callusbildung anregen. BARTH empfahl, da nach seiner Theorie alle Zellen des Implantats absterben und beim Einbau von auto-, homoio- und heteroplastischen Spänen mit oder ohne Periost kein Unterschied besteht, die Verwendung mazerierten Materials. Diese Ansicht führte in der Knochenchirurgie zu weiteren Versuchen mit alloplastischen Stoffen wie Hartgummi, Elfenbeinstäben und Goldprothesen.

MARCHAND, der Barths Versuche wiederholte, bestätigte, daß die Zellen des Transplantats trotz sofortiger Replantation zum größten Teil zugrunde gehen. Seiner Meinung nach sind die Osteoblasten des Lagers am Ersatz beteiligt, indem sie mit den Gefäßen in die Markräume und Kanäle des Spans eindringen. Diese Zellen seien nach Auflösung der alten Knochensubstanz dazu befähigt, die hierbei freiwerdenden Kalksalze zum Aufbau des neuen Knochens zu verwenden.

Wenn man auch im Laufe der Zeit von der Verwendung mazerierten und alloplastischen Materials im Sinne BARTHs abkam, so löste diese im Gegensatz zu OLLIER stehende Ansicht doch neue Untersuchungen auf dem Gebiete der Knochen transplantation aus.

Die Leistung des Transplantatperiosts ist in klinischer Hinsicht bedeutsam und erklärt die richtige Beobachtung OLLIERs, gleichzeitig aber auch seinen Irrtum, wenn er glaubte, daß der Span durch das ihm anhaftende Periost am Leben erhalten worden sei. In Wirklichkeit war die Substitution des abgestorbenen Knochengewebes bei gleichzeitig stattfindender periostaler Knochenneubildung so vollkommen geworden, daß nach längerer Versuchsdauer das histologische Bild eine lebende Einheilung des Spans vortäuschte.

AXHAUSEN (1909) verpflanzte periostgedeckte, autoplastische Späne in die Mus-

kulatur und erhielt neuen Knochen zwischen dem Transplantat und dessen Periost, während periostlose und ausgekochte Implantate keine Callusbildung zeigten. Junges Periost war nach freier Überpflanzung osteogenetisch wirksam. Aus seinen Versuchen schloß er, daß wohl die Hartsubstanz des Spans im wesentlichen abstirbt, Periost und Mark jedoch teilweise überleben können. Vor allem seien es die Zellen der Cambiumschicht, welche sich erholen und dann zur Quelle des neuen Knochens werden können. AXHAUSEN ist der Ansicht, daß die osteogenetischen Zellen des Periosts erwachsener Hunde zwar ihre osteogenetische Tätigkeit eingestellt haben, wohl aber zur Knochenneubildung auch weiterhin befähigt sind. Die Auslösung der Osteogenese durch diese "ruhenden Periostzellen" sei an das Vorhandensein absterbenden Knochengewebes gebunden. Diese von OLLIER und AXHAUSEN erwähnte Abhängigkeit der knochenbildenden Kraft des Transplantatperiosts vom jeweiligen Alter der Versuchstiere veranlaßte RIESS (1924) zu neuen experimentellen Studien über die osteogenetischen Fähigkeiten des Periosts. Da BÄTZNER (1920, 1921) bei freien Periostverpflanzungen in die Muskulatur von mehrjährigen Hunden keine Knochenbildung finden konnte, legte RIESS besonderen Wert auf die möglichst genaue Kenntnis des Alters und die histologische Beschaffenheit des zur Verpflanzung verwendeten Perioststreifens. In seinen Versuchen zeigte sich am Periost von Hunden, welche nicht älter als 9 Monate waren, neuer Knochen. Bei über 9 Monate alten Hunden konnte RIESS die Cambiumschicht nicht mehr entdecken. Er sieht den Grund des Mißlingens anderer Forscher bei Periostverpflanzungen darin, daß bei unvorsichtigem Abschaben der Knochenhaut die Cambiumzellschicht von ihren ernährenden Gefäßen losgelöst wurde und dadurch zugrunde ging. In neuerer Zeit überprüfte W. AXHAUSEN (1962) die knochenbildende Kraft des Periosts an folgenden Versuchen: Ein periostgedeckter Knochenspan wurde aus der Tibia eines Hundes entnommen, in zwei Teile geteilt und von der einen Hälfte das Periost sorgfältig abgekratzt. Beide Stücke wurden in die Rückenmuskulatur des gleichen Tieres eingepflanzt. Bereits 8 Tage nach der Transplantation hatte sich unter dem Periost des periostgedeckten Spans eine deutliche Schicht neugebildeten Knochens eingelagert, während auf der periostalen Seite des periostlosen Spans keine Knochenneubildung erkennbar war. W. AXHAUSEN erklärt die subperiostale Knochenneubildung, die etwa 4 Tage nach der Transplantation einsetzt (nach J. DE JONG und VAN DER KEMP, 1928), durch das Überleben spezifischer Periostzellen. Weiterhin konnte W. AXHAUSEN bei ausgewachsenen Hunden in zwei Fällen den Beweis erbringen, daß die Knochenhaut auch nach Abschluß ihres physiologischen Wachstums noch zur Knochenneubildung befähigt ist, sobald sie durch eine Schädigung "aktiviert" wurde (LEXER, 1924; G. AXHAUSEN, 1920). Eine Aktivierung kann erreicht werden:

1. in situ durch Schädigung des darunterliegenden Knochens und spätere Entnahme eines Perioststreifens,
2. durch zusätzliche Transplantation absterbenden Knochengewebes.

W. AXHAUSEN konnte mit diesen Versuchen das Argument LEVANDERS, daß nämlich die Knochenhaut nicht osteogenetisch wirksam sei, entkräften. In anderen Versuchen stellte W. AXHAUSEN fest, daß bei freier Überpflanzung isolierter Perioststreifen durch straffes Einnähen in die Muskulatur sich wesentlich bessere Einheilungsbedingungen ergaben als durch loses Einlegen. Im ausgespannten Periost können sich die elastischen Fasern nicht zusammenziehen, wodurch die Saftspalten und die Gefäßlumina geöffnet bleiben, was dem Gewebssaft und den Gefäßkapillaren das Eindringen erleichtert. Bei losem Einlegen dagegen rollt sich das Periost zusammen, wobei seine Gefäße verschlossen werden und somit schlechtere Ernährungsbedingungen bestehen.

BONNET und SCHULZ (zit. bei RIESS) erforschten den histologischen Aufbau des Periosts und unterscheiden folgende Schichten:

- a) die gefäßreiche Adventitia,
- b) die Fibro-Elastica und
- c) die Cambiumzellschicht.

Diese histologische Differenzierung ist aber nur im embryonalen Leben und in früher Jugend deutlich zu erkennen. Mit zunehmendem Alter der Versuchstiere wird die Cambiumzellschicht immer dünner, so daß sie nur noch auf Schrägschnitten zu sehen ist.

Die Osteoblastenlehre bekam durch die klinischen Erfolge von LEXER neuen Aufschwung. Er mißt dem Periost die absolut führende Stellung bei der Knochenneubildung zu. "Der Callus wandert die Wege, die das Periost vorschreibt." (zit. aus LEXER, 1929) LEXER prägt den Begriff des ersatzstarken bzw. ersatzschwachen Lagers. In ein ersatzstarkes Lager gelangt ein Pflänzling, wenn er Lagerperiost zum Anschluß erhält. Hier gehen die osteogenetischen Kräfte sowohl vom lebenden Knochengewebe des Lagers als auch vom Transplantat aus, während im ersatzschwachen Weichteillager die Regenerationsvorgänge nur vom Span stammen. Periost und Mark sind zur Erhaltung des Implantats als Schutz und Ernährungsmembran notwendig, einerseits um die Resorption zu hemmen, andererseits um den Umbau zu gewähren. MAC EWEN (1912) dagegen bezeichnete das Transplantatperiost als eine nutzlose, die Einheilung verzögernde "limiting membrane". Der Osteocyt ist für ihn der Ausgangspunkt allen Wachstums. Die Osteoblasten entstehen nach ihm aus den Osteocy-

ten und nicht die Osteocyten aus den Osteoblasten. Er hielt die Proliferationsfähigkeit der Knochenzelle für sehr groß und empfahl zur Oberflächenvergrößerung kleine, periostlose Diaphysenstücke.

Für die Vertreter der Osteoblastenlehre steht fest, daß neuer Knochen nur aus Zellen des Knochengewebes entstehen kann. Diese Lehre blieb jedoch in der Folgezeit nicht unwidersprochen, da manche Phänomene nicht mittels ihrer Grundsätze erklärt werden konnten; so muß neuer Knochen im Wirtsgewebe gebildet werden, wenn alle Knochenzellen des Spans abgestorben sind. Warum sind Corticalisspäne ohne Periost und ebenso vorbehandelte, tote Späne osteogenetisch tätig? Die unbefriedigende Antwort der Osteoblastenlehre auf diese Fragen und die Ergebnisse BARTHs haben das Interesse der Forscher mehr und mehr auf die Reaktion des mesenchymalen Gewebes in der Umgebung des Spans gelenkt.

Ganz neue Gesichtspunkte zur Frage der Osteogenese eröffnet die Arbeit von PETROW und BASCHKIRZEW (1912). PETROW gibt in einer Stellungnahme zu den Versuchsergebnissen von MAYER und WEHNER zu, daß ein überlebender Teil des Transplantatperiosts Callus bilden kann, behauptet aber, daß die Dauerhaftigkeit dieser Neubildung fraglich und ihre Abgrenzung von aus Bindegewebe gebildetem Knochen oft nicht möglich sei. BASCHKIRZEW bewies in seinen Versuchen, daß periostlose autoplastische Späne bei Verpflanzung in Muskulatur und Haut keineswegs resorbiert werden, wie die Vertreter der Osteoblastenlehre annehmen, sondern einheilen und durch neues Knochengewebe ersetzt werden können. Die autoplastische Transplantation eines periosthaltigen und periostlosen Spans in die Kaninchenmuskulatur ergab lediglich eine schnellere Einheilung des periostgedeckten Spans. Als Hauptquelle der Regeneration bei Knochenverpflanzungen in ein Muskellager kommen junge, pluripotente Bindegewebszellen in Frage, welche den Span umwachsen, in alle Markräume und Kanälchen eindringen und dort zu Osteoblasten metaplasieren. Mit dieser Erkenntnis, daß unspezifische Zellen des Lagerbindegewebes sich in knochenbildende Zellen verwandeln können, war die Metaplasielehre begründet.

Unbeantwortet bleibt aber nach wie vor das "Wie" der Osteogenese, die Frage nach dem die Metaplasie auslösenden "Agens". Das unspezifische Zellmaterial muß doch durch ein spezifisches Stimulans zur Umwandlung angeregt werden.

Mit zunehmendem Interesse für die Metaplasielehre suchte man nach einer osteogenetisch wirksamen Substanz, welche Bindegewebszellen zur Metaplasie in Osteoblasten "induziert".

SPEMANN und MANGOLD (1924) stellten in ihren Versuchen fest, daß spezifische Zellen, sog. "embryonic organizer", an einem genau lokalisierten Ort der Blastopore von Amphibien zur Bildung der primitiven Embryoachse notwendig sind. Bei Verpflanzung dieser Zellen an einen anderen ektopischen Platz der Gastrula wurden die dort befindlichen Zellen ebenfalls zur Bildung einer Embryoachse angeregt.

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, daß auch an der Osteogenese spezifische Zellen beteiligt seien, welche auf mesenchymales Bindegewebe induzierend wirken.

Die ersten erfolgreichen Versuche in dieser Richtung unternahm LEVANDER (1928, 1940). Er zog aus den histologischen Untersuchungen frei überpflanzter, periostloser Corticalisstücke den Schluß, daß die Knochenneubildung nicht auf der osteogenetischen Aktivität transplantiert und überlebender Zellen beruhe, sondern daß sie von jungem, proliferierendem Lagerbindegewebe ausgehe. Auch dem Periost spricht LEVANDER jegliche osteogenetische Fähigkeit ab, da er an ausgewachsenen Hunden nach Implantation isolierter Knochenhautstücke keine Knochenneubildung auslösen konnte. Das die Induktion auslösende Agens suchte er im Span, aus dessen absterbenden Zellen ein Nekrohormon (= Osteogenin) frei würde.

Diese hypothetische Annahme führte zu mehr oder minder erfolgreichen Versuchen, eine Substanz aus zugrundegehendem Knochengewebe zu isolieren (LEVANDER und WILLSTAEDT, 1946; ANNERSTEN, 1940; LACROIX, 1951; ROTH, 1952). LEVANDER injizierte den aus autologem Knochenbrei mit angesäuertem Alkohol extrahierten "osteogenen Faktor" in Kaninchenmuskulatur und konnte bei 70 Versuchstieren mit einer Erfolgsquote von 22% eine Knorpel- und Knochenneubildung nachweisen. Seine Kontrollversuche mit reinem Alkohol jedoch verliefen ergebnislos. SCHINK (1954) ging in umfassenden experimentellen Studien der Existenz eines osteogenen Faktors nach. Er verpflanzte Späne, die in einen Collodiumfilm eingehüllt waren, in die Rückenmuskulatur von Meerschweinchen. Diese Membran ist zwar für Zellen undurchlässig, jedoch nicht für Flüssigkeiten, wie z.B. den osteogenen Faktor. Anfangs zeigte sich keine Knochenneubildung, während nach Sprengung der Membran Osteoid gebildet wurde. Nach SCHINK konnte der osteogene Faktor wegen des von außen nach innen gerichteten Flüssigkeitsstroms nicht in das Weichteillager vordringen. Erst nach Sprengung der Collodiumschicht infolge hohen Innendrucks konnte der "K-Faktor" seine osteogenetische Wirkung entfalten.

In anderen Versuchen ging SCHINK von der Tatsache aus, daß Röntgenstrahlen die mitverpflanzten Weichteile wie Periost, Endost und Gewebe der Havers'schen

Kanäle abtöten ohne aber den osteogenen Faktor zu schädigen. Er implantierte in das omentum maius von Meerschweinchen mit Röntgenstrahlen vorbehandelte Späne. Der hierbei gebildete Knochen kann also nur durch Metaplasie des umgebenden Bindegewebes entstanden sein, wobei SCHINK auf die Möglichkeit der induzierenden Wirkung eines vom toten Span frei werdenden Stoffes hinweist. Nach BIER und MARTIN (1924) soll ein von der Markhöhle ausgehender Reiz die Callusbildung auslösen.

OBERDALHOFF (1947, 1948) sieht in der Knochenneubildung überhaupt keine zellulär beeinflusste Leistung, sondern einen humoralen Vorgang. Der "K-Faktor" soll seine Wirksamkeit bei der Ausströmung durch die Lymphspalten des Gewebes entfalten. Dem Periost ist jede spezifische knochenbildende Funktion abzusprechen.

ROTH (1952) überprüft in Extraktversuchen am Kaninchen, ob die osteogenetische Substanz durch Kältekonservierung eine Schädigung erfährt. ROTH schloß aus seinen Versuchen, daß chemische Einflüsse, große Hitze- oder Kälteeinwirkung die osteogenetische Substanz unwirksam machen können. Er ist wie LEVANDER der Ansicht, daß ein aus der Grundsubstanz durch Alkohol extrahierbarer Faktor eine bedeutsame Rolle spiele. URIST und McLEAN leisteten mit ihrer Arbeit aus dem Jahre 1952 einen wichtigen Beitrag zur Lösung des Problems der Knochenbildung durch Induktion. Sie verpflanzten in 250 Versuchen verschiedene muskuloskeletale Gewebsteile wie Periost, Knochenmark, Compacta und Frakturcallus in die vordere Augenkammer von Ratten, um ihre Fähigkeit zur Osteogenese zu überprüfen. Das Auge wurde zum Transplantatbett gewählt, da es die ständige Beobachtung des Spans erleichtert und einen direkten Kontakt mit dem Wirtsgewebe ausschließt.

Während sich um die nekrotischen Knochenbälkchen autoplastischer Corticalisspäne erst nach vier Wochen spärlicher neuer Knochen bildete, lagerte sich um autoplastische Spongiosaspäne schon viel früher neuer Knochen ab. Da Transplantation von Frakturhämatom in die vordere Augenkammer nicht zur Callusbildung anregte, kann die Hämatomflüssigkeit auch keinen osteogenen Faktor enthalten. Von 27 frisch verpflanzten, autoplastischen, fibrocartilaginösen Callusstücken zeigten 23 einen außerordentlich hohen Grad osteogenetischer Aktivität, wobei die Osteogenese an der Oberfläche der Transplantate begann. Die Späne wurden von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, deren Gefäßknospen in das Transplantat eindrangten. Drei der gekochten und eines der gefrorenen Implantate autoplastischen, abgetöteten Bindegewebscallus veranlaßten ebenfalls Knochenneubildung, jedoch erst nach 4 - 5 Wochen, während sie bei den fri-

schen Spänen schon 2 Wochen post transplantationem auftrat. Die Verpflanzung autoplastischer und homoioplastischer Epiphysenknorpelstücke ergab nach 2-3 Wochen ebenfalls neues Knochen-
gewebe.

URIST kam zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Die Osteocyten haben auch im frischen, autoplastischen Transplantat nicht die Fähigkeit zu überleben.
- 2.) Der frische, autoplastische Spongiaspan ist dem Corticalispan bezüglich der Knochenneubildung überlegen, weil in ihn die Gefäße und Wirtszellen schneller eindringen können.
- 3.) Die größte Aktivität zeigt fibrocartilaginöser Callus, dessen Zellen ihre osteogenetische Potenz auf einwachsende Mesenchymzellen übertragen.

Folgende histologische Beobachtungen sprechen für Knochenneubildung durch Induktion:

- a.) Die von der Spanoberfläche zum Spaninneren fortschreitende Ablagerung osteoiden Gewebes und der Zusammenhang zwischen Gefäßeinsprossung und Osteogenese. Die mit den Gefäßen einwachsenden, perivaskulären Bindegewebszellen scheinen der Ursprung der neuen Knochenzellen zu sein.
- b.) Bei abgetöteten Spänen muß die Knochenneubildung von den einwachsenden Zellen des lebenden Bindegewebes ausgehen, da totes Material nicht zur Osteogenese befähigt ist.
- c.) "Schleichende Substitution" ist im wesentlichen ein Vorgang, der sich bei der Knochenneubildung durch Induktion abspielt.

Die Ergebnisse von drei erst kürzlich erschienenen experimentellen Untersuchungen lassen vermuten, daß ein diffusionsfähiger Faktor undifferenziertes Bindegewebe zur Osteogenese induziert. So zeigte GOLDHABER (1961), daß in "Millipore" eingehüllte, frische, homoioplastische Späne auch nach Transplantation in vorher sensibilisierte Mäuse in dem umgebenden Gewebe neuen Knochen bilden. Es wäre möglich, daß ein osteogenetischer, diffusionsfähiger Faktor erzeugt wird, der innerhalb des "Millipore" -Gitters neuen Knochen hervorruft und daß dieser "Induktor" auch außerhalb dieser "Millipore"-Kammer in einem begrenzten Bereich wirksam wird.

MOSS (1960) verarbeitete mark- und periostlosen Kalbsknochen zu einer toten Paste und extrahierte daraus den vermuteten Induktionsfaktor mit Hilfe von Ringer-TyrodLösung. "Gelfoam"-Schwamm wurde mit diesem Extrakt imprägniert und unter die Leptomeninx, in die Milz und in die Schenkelmuskulatur von Ratten verpflanzt. Er erhielt dabei folgende Ergebnisse:

- a. Die Implantation unter die Leptomeninx führte zu Knochenneubildung;
- b. die aus Knochen- und Knorpelpuder isolierten Osseomuco- und Chondromucoproteine bildeten nach subleptomeningealer Verpflanzung ebenfalls neuen Knochen.

Alle Implantationen des Testmaterials in Milz und Schenkelmuskulatur von erwachsenen Ratten verliefen erfolglos. Bei einwöchigen Ratten hingegen trat in 7 von 10 Fällen nach 30 Tagen Knochen- und Knorpelbildung auf. Das Alter der Versuchstiere scheint also von ausschlaggebender Bedeutung zu sein.

Mit Punkt b bestärkt MOSS die Annahme EASTOEs, daß der Induktionsfaktor in den Mucoproteinen zu suchen sei.

Über ähnliche Ergebnisse wie MOSS und GOLDHABER berichten ANDERSON und Mitarbeiter nach Schwammverpflanzungen in die vordere Augenkammer von Ratten (ANDERSON, DINGWALL, 1960).

Über den Vorgang der Induktion bestehen heute vier Theorien:

1. THEORIE DER CHEMISCHEN DIFFUSION

(nach HOLTFRETER u. HAMBURGER, 1955)

Nach dieser Theorie ist ein Kontakt von Zelle zu Zelle nicht nötig. Man wies die Diffusionsfähigkeit des Induktionsfaktors durch Anwendung von Filtern nach, welche die Zellen mit der wirksamen Substanz zurückhielten.

GROBSTEIN (1956) demonstrierte die Diffusionsfähigkeit der Induktionsfaktoren, welche in metanephrogenem Gewebe enthalten waren.

2. THEORIE DES ZELLKONTAKTS

(WEISS, 1950)

WEISS sieht die Induktion als Ergebnis einer Wechselwirkung zwischen den Oberflächenmolekülen der beteiligten Zellen. Durch eine Molekülverschiebung im Zellinneren und an deren Oberfläche finde die Umwandlung statt.

3. THEORIE VOM ZELLKONTAKT UND INTERZELLULARER MATERIALÜBERTRAGUNG

(BRACHET, 1945)

Hier wird den Ribonukleinsäuren (RNS) eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben. Die Übertragung der induzierenden Substanz nimmt den Weg einer Virusübertragung.

4. THEORIE DER "MATRIX - INTERACTION"

(GROBSTEIN, 1956)

Veränderungen der Matrix (z. B. Verminderung des Flüssigkeitsvolumens durch einen höheren Polymerisationsgrad der mucoproteinreichen Interzellulärsubstanz) sollen die Induktion auslösen.

Trotz vieler neuer Erkenntnisse sind manche Probleme der Osteogenese weder mit der Osteoblasten- noch mit der Induktionslehre zu erklären. So konnte W. AXHAUSEN bei der Überprüfung der LEVANDERSchen Extraktversuche am Hund in keinem Fall Knorpel- oder Knochenneubildung finden. Hierzu ist zu bemerken, daß die bisherigen Extraktversuche hauptsächlich am Kaninchen durchgeführt wurden, dessen besondere Neigung zur heterotopen Knochenneubildung schon lange bekannt ist (nach v. SEEMEN, 1929; SEVERI, 1933).

HEINEN, DABBS und MASON (1949) konnten beweisen, daß Kaninchen schon auf reine Alkoholinjektionen hin mit Knochenbildung antworteten. SCHINK gelang es nur in einigen Fällen, am Meerschweinchen Knochenbildung durch intramuskuläre Injektion salzsäuren Alkohols zu erzielen. Außerdem glückte es NOBUKATSU (1930) durch Formalininjektion in das Auge eine Verknöcherung herbeizuführen.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Knochenbildung in der Muskulatur auf die gewebsschädigende Wirkung des Alkohols zurückzuführen ist und nicht, wie LEVANDER glaubt, auf eine spezifische osteogenetische Substanz in seinem Knochenextrakt.

W. AXHAUSEN (1952) versucht die Osteoblastenlehre und die Induktionstheorie miteinander zu verbinden. Er verpflanzte ausgewachsenen Hunden autoplastische periostgedeckte Tibiaspäne, welche in autologem Blut bei -32°C 24 Stunden lang aufbewahrt wurden, in die Oberschenkelmuskulatur. Um Vergleichsmöglichkeiten zu haben, unternahm er die gleichen Versuche mit frischen, autoplastischen Spänen. Aus den Resultaten schloß AXHAUSEN, daß das verpflanzte Gewebe durch Kälteeinwirkung abgetötet wurde. Die Knochenneubildung um den 21. Tag sei auf die Umwandlung spezifischer Bindegewebszellen der Umgebung zurückzuführen, und zwar unter dem Einfluß des toten Knochen-

spans.

Die Knochenbildung nach frischer Autoplastik um den 4. bis 5. Tag werde jedoch durch überlebendes, knochenbildungsfähiges Gewebe des Spans hervorgerufen. Nach AXHAUSEN verläuft also die Knochenregeneration in zwei Phasen, welche durch den Zeitpunkt ihres Auftretens deutlich differenziert sind. Von diesen zwei Phasen dürfte die erstere von präexistenten, spezifischen Zellen ausgehend, die zweite, spätere Phase oft weitgehend überdecken.

HEY GROWES, PAGE und PERKINS (1917, 1922) sind der Ansicht, daß die wesentliche Funktion des Transplantats darin bestehe, dem jungen Knochen als Leitschiene zu dienen.

Die knochenbildende Kraft des Kieler-Spans (MAATZ und BAUERMEISTER, 1958) ist weder mit der Osteoblastenlehre, noch mit der Induktionstheorie zu erklären. Da diesem Span durch Enteiweißung und Entfettung seine organischen Bestandteile entzogen wurden, kann das "Osteogenin" nicht aus absterbenden Zellen des Spans frei werden. Die Tatsache, daß diese toten Späne im Weichteillager Knochen bilden, zeigt, daß überlebende Osteoblasten auch nicht als Knochenbildner in Frage kommen. Die osteogenetische Potenz muß also nach Entfernung der organischen Substanz in den anorganischen Bestandteilen des Spans gesucht werden. BAUERMEISTER u. a. sehen in dem chemischen Reiz des anorganischen Baustoffes den osteogenen Faktor. Der junge Knochen hat, da er kalkärmer und reicher an organischer Grundsubstanz ist als der alte, eine größere Baustoffoberfläche. Die spongiöse Struktur des Kieler-Spans bewirkt, daß er infolge seines aufgelockerten Baues dem einsprießenden Bindegewebe als Leitschiene dient. Dagegen spricht, daß in Kunststoffschwämmen nur wenig Knochen gebildet wird.

Diese chronologische Übersicht zeigt die Wurzeln der heute bestehenden Theorien des Transplantateinbaus; sie zeigt aber auch, daß den verschiedenen Ansichten nicht vergleichbare, experimentelle Grundlagen oder mit den neueren Erkenntnissen der Anatomie und Physiologie des Knochens nicht vereinbare Ergebnisse zugrunde liegen.

An dieser Stelle sei deshalb dem experimentellen Teil dieser Arbeit ein kurzer Abriß der modernen Erkenntnisse der Osteologie vorangestellt.

B. ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DES KNOCHENS

In der früheren Darstellung der Anatomie galt das Skelett als das feste, wenig veränderliche Baugerüst des menschlichen Körpers. Erst die Studien über die funktionelle Struktur des Knochengewebes haben gezeigt, daß es wie alle anderen Bausteine des Körpers einem Wechsel unterliegt, der nur nicht nach außen sichtbar wird.

I. Die chemische Struktur des Knochens.

Das Knochengewebe baut sich aus drei Komponenten auf:

1. Matrix: a) Kollagen
 b) Grundsubstanz
2. Zellen: c) Osteoblasten und Osteocyten
 d) Osteoclasten
3. Hydroxyapatitähnliche Mikrokristalle.

Matrix und Zellen bestehen aus organischer, die Kristalle dagegen aus anorganischer Substanz.

1. Definition der "Matrix":

Nach Herauslösen des anorganischen Anteils aus dem Knochengewebe bleibt ein elastisches Material übrig, welches als organische Matrix bezeichnet wird (LE GROS CLARK zit. bei EASTOE in BOURNE, Kap. IV, 1956). Dieser Ausdruck leitet sich von dem lateinischen Wort matrix = Bauch ab. Im heutigen Sprachgebrauch bedeutet Matrix ein Medium, in dem sich etwas entwickelt. Der organische Teil des Knochengewebes besteht aus einem Faserflecht, welches die anorganischen Kristalle birgt. Diese Definition der Matrix, basierend auf der Existenz von Mineralkristallen ist nur gerechtfertigt, wenn sie auf Knochengewebe oder dessen Vorstufen angewandt wird.

a) Kollagen.

Allgemeines: Kollagen ist ein faseriges Protein, welches im mesodermalen Gewebe der Wirbeltiere vorkommt. Die Proteine der Säugetiere und der Vögel unterscheiden sich nur in geringen Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung. Das Kollagen stellt 30% des Proteins bei der Ratte (NEUBERGER, 1951). Im Knochen liegt das Kollagen in Form kollagener Fasern vor, die von einer organischen Grundsubstanz und anorganischen Salzen maskiert werden.

Die Makromoleküle der kollagenen Faser setzen sich aus folgenden Aminosäuren

zusammen: Prolin (15-16%), Hydroxyprolin (13-14%), Glycin (27-29%) und einem geringen Prozentsatz aromatischer und schwefelhaltiger Aminosäuren (NEUMAN, 1949; GUSTAVSON, 1949 bei ROUILLER in BOURNE, Kap. V, S. 108, 1956). Ein Kollagenmolekül ist $640 \text{ \AA}$ lang und soll aus 670-700 Aminosäureresten bestehen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 63 000 bis 65 000 (nach ROUILLER in BOURNE, 1956).

Jede kollagene Faser baut sich aus Protofibrillen auf (BEAR, 1952). Nach PAULING und COREY (1951) verflechten sich drei Polypeptidketten zu einem Kollagenmakromolekül. Für die Helixanordnung spricht die Dehnbarkeit bis zum 4-fachen der ursprünglichen Kettenlänge. Die anschaulichsten Modelle über die Kollagenstruktur stammen von RICH und CRICK (1955, 1958 zit. bei GLIMCHER in: Calcification in Biological Systems, S. 421, 1960). Nach diesen Modellen setzt sich jedes Makromolekül aus drei Polypeptidketten zusammen, von denen jede eine gegen den Uhrzeigersinn laufende Spirale um eine Achse bildet. Diese drei linksgeschraubten Spiralen liegen weder zueinander noch zur Faserachse parallel, sondern winden sich wiederum mit ihrer Achse im Uhrzeigersinn um eine Hauptachse, wodurch die verflochtene Struktur entsteht (sh. Abb. 3a, b, c bei GLIMCHER, S. 431). Diese dreifach gewundene Helix wird durch Wasserstoffbrücken aneinandergebunden. Nach den Ergebnissen elektronenmikroskopischer Studien von ROBINSON und WATSON (1952) zeigen die Fasern eine periodische, axiale Wiederholung von $610\text{-}640 \text{ \AA}$. Die räumlichen Beziehungen zwischen den Hauptketten sind von den verschiedenen Seitenkettensubstituenten abhängig. Diese gehen mit den Resten der benachbarten Polypeptidketten eine für sie charakteristische Bindungsart ein:

1. Nicht-polare Seitengruppen wie z.B. Glycin, Prolin, Alanin binden die Polypeptidketten durch elektrostatische Kräfte.
2. Hydroxyl enthaltende Seitenketten, wie z.B. Hydroxyprolin, Serin binden die Polypeptidketten durch Wasserstoffbrücken.
3. Seitenketten aus sauren und basischen Aminosäuren sind positiv oder negativ geladen und bilden direkte Valenzbindungen.

In einem pH-Bereich, der unter dem isoelektrischen Punkt liegt, besitzt das Molekül nur positiv geladene Gruppen; bei pH-Anstieg über den isoelektrischen Punkt wird das Molekül negativ geladen. Da sich in vivo das Kollagen in einem Bereich von $\text{pH} = 7$ befindet, der isoelektrische Punkt jedoch bei einem $\text{pH} = 9,4$ liegt, ist das Molekül positiv geladen und benötigt zur Neutralisation negativ geladene Ionen. In den Geweben bieten sich die Chloridionen als Neutralisationspartner an. Im Knochen wird das Kollagen wahrscheinlich mit dem Ionengitter des Hydroxyapatits verbunden, indem die positiv geladenen Kolla-

genmoleküle oberflächennahe Calciumionen ersetzen.

Zur Kollagenbildung.

NAGEOTTE (zit. bei ROUILLER in BOURNE, Kap. V, S. 108) zeigte mit in vitro Versuchen erstmals, daß in schwachen Säuren gelöstes Kollagen nach Zugabe von Natriumchlorid zur Präzipitation von Fibrillen führte, welche die gleichen optischen Eigenschaften wie natürliches Kollagen aufwiesen. Die Faserdicke ist von der Wasserstoffkonzentration, der Salzkonzentration und der Zeit abhängig, wielange das Kollagen in der Lösung ist (VANAMEE und PORTER, 1951). So sind z.B. bei pH zwischen 4,8 und 5,8 die Fasern breit, während bei höheren Säurekonzentrationen dünnere Fasern entstehen.

Andererseits wurde die Faserbildung an Gewebskulturen (PORTER, 1951) und heilender Wunden (BUCK, 1953) studiert. Zwei bis vier Tage nach dem Erscheinen von Fibroblasten entwickelten sich in der metachromatischen Grundsubstanz rasch dicker werdende Fibrillen.

Theorien der Kollagenbildung.

1. Cytologische Faktoren:

Heute besteht die Ansicht, daß die Fibroblasten für die Kollagenbildung unerläßlich sind. FLEMING (1897) und LAGUESSE (1921) glauben, daß Kollagen im Cytoplasma gebildet und anschließend ausgestoßen wird (=intrazelluläre Kollagenbildung).

Eine andere Funktion der Fibroblasten soll die Bildung von Enzymen sein, welche die Kollagenentstehung einleiten (=Extrazelluläre Kollagenbildung). PORTER beobachtete 1951 elektronenmikroskopisch die Fibrillogenese der Haut von Hühnerembryonen. Das Ektoplasma wandelte sich in Fibrillenstücke um, welche die Zelloberfläche erreichen und zu reifen Kollagenfasern polymerisieren.

Eine weitere aktive Funktion der Fibroblasten ist die Sekretion von Grundsubstanz (MEYER, 1947; CURRAN, 1953). Durch Sekretion von Enzymen soll während der Wundheilung das Fibrinnetz in Kollagen verwandelt werden. Andererseits ergaben Versuche mit einer transparenten Ohrkammer, daß das Fibrinfasernetz während der Kollagenbildung unverändert blieb und nur als Stütze für die Fibroblasten diente (STEARNS, 1940; WEISS, 1929; BUCK, 1953).

2. Chemische Faktoren:

Viele Autoren (SYLVEN, 1941; MEYER, 1947; RANDALL, 1952; CURRAN, 1953 u. a.) sind der Ansicht, daß die Mucopolysaccharide mit der Fasergene-

se in Verbindung stehen. Die Matrix zur Bildung der Kollagenfasern ist nach CURRAN die Hyaluronsäure. Ein anderes saures Mucopolysaccharid, das Chondroitinsulfat, soll wegen seiner nicht-ionisierten Gruppen zur An-einanderkittung der Fasern befähigt sein (PARTRIDGE, 1948).

3. Enzyme:

Die erhöhte alkalische Phosphatase an Orten der Kollagenbildung wird als Beweis für die aktive Rolle dieses Enzyms bei der Faserentstehung ange-führt (BUCK, 1953).

b) Die Grundsubstanz.

"Die Grundsubstanz ist ein amorphes, strukturloses, extrazellulär liegen-des Material, das funktionelle und morphologische Beziehungen zu Fibro-cyten und Bindegewebsfasern zeigt" (zit. nach DORFMAN, 1953; GROSS, 1953).

Die Hypothese einer "Kittsubstanz", welche die kollagenen Fasern zusam-menhält, wird in neueren Studien von DAY und EAVES (1953) unterstützt. Letztere sind der Ansicht, daß die Grundsubstanz aus:

1. einem amorphen Anteil,
2. kleinen, lichtbrechenden Granula
3. einem netzartigen Fasergeflecht aufgebaut ist.

Da durch Behandlung mit Trypsin das Netzwerk aufgelöst wurde, glaubt DAY, daß die Kittsubstanz aus einem Protein besteht.

Chemie:

- 1) Polysaccharide: Die Grundsubstanz soll saure Polysaccharide in hoch-molekularem Zustand (z. B. Hyaluronsäure, Chondro-itinsulfat) enthalten.
- 2) Protein: Ein weiterer Bestandteil ist strukturloses Protein, da nach wässrigen Extraktionen mesenchymaler Gewe-be die Polysaccharide mit einem Proteinkomplex ver-bunden sind, dessen genauer Bau noch unbekannt ist.
- 3) Elektrolyte: Die Grundsubstanz weist einen höheren Gehalt an Na-Ionen als an Cl-Ionen auf. Die ionisierten SO_4^- und Carboxylgruppen deuten die kationenbindende⁴ Fähig-keit an (NEUMAN, BOYD und FELDMAN, 1952).
- 4) Citrat: Dieses organische Anion scheint mit dem anorgani-schen Kristallgitter in Verbindung zu stehen und an der Verkalkung beteiligt zu sein (NEUMAN u. NEU-

MAN, 1953).

5) Wasser:

Ein Teil des extrazellulären Gewebswassers ist an Proteine und Polysaccharide gebunden (McMASTER u. PARSONS, 1950 zit. bei SYLVEN in BOURNE). Als Beweis hierfür wird gefäßloses, mesenchymales Bindegewebe angeführt wegen seines Polysaccharidgehalts und seiner großen Wasserbindungsfähigkeit.

Das Wasser und die Elektrolyte der Grundsubstanz stammen wahrscheinlich aus dem Blut; Proteine, Peptide und Aminosäuren werden teils aus dem Protein-Reservoir (GITLIN u. JANEWAY, 1953) und teils von den Fibrocyten abgeleitet. Die Polysaccharide sollen von den Fibrocyten (BENSLEY, 1934; TEILUM, 1946), den Mastzellen (SYLVEN, 1941) oder im Blut erzeugt werden (RENAUT, 1903). Nach ASBOE-HANSEN (zit. bei SYLVEN in BOURNE, Kap. III, S. 53) produzieren die Mastzellen unter hormonellem Einfluß die Hyaluronsäuren der Grundsubstanz.

Physiologische Aspekte:

Die Polysaccharide beeinflussen die Fasergenese (GROSS, 1950, 1953). Der relativ hohe Gehalt an Grundsubstanz in gefäßlosem Bindegewebe deutet auf ihre wesentliche Transportfunktion im Stoffwechselgeschehen hin (SYLVEN, 1951). Es wird angenommen, daß die Mucopolysaccharide (M.P.S.) der Grundsubstanz durch Bindung ionisierten Calciums die Verkalkung blockieren können. Hierbei wird das zur Kristallisation an oder in die kollagenen Fasern herantransportierte Calcium von den M.P.S. gleichsam abgefangen (GLIMCHER, 1960).

2. Zellen

c) Die Osteoblasten.

Als erster befaßte sich GEGENBAUR (1864; 1867) mit dem Studium der Knochenzellen. Er nannte knochenbildende Zellen, die sich ursprünglich vom embryonalen Mesenchym ableiten, Osteoblasten. Noch heute bestehen verschiedene Meinungen über deren Funktion sowie ihre morphologische Spezifität. Während für KEITH (1919) und die Mehrzahl der Autoren die Osteoblasten spezielle, knochenbildende Zellen sind, bezeichnen sie LERICHE und POLICARD (1929) als degenerierende Fibroblasten.

Größe und Form:

Die Osteoblasten sind verschieden groß. Nach KOELLIKER (1889) sind aktive Osteoblasten beim Menschen etwa 15 bis 80 μ lang. Im Vergleich zu den länglichen

Fibroblasten haben die Osteoblasten eine kompaktere und dickere Zellform. Sie ordnen sich rosettenförmig an der Oberfläche neugebildeter Trabeke an, wobei sie eine birnenähnliche Form annehmen.

Fortsätze:

Feine, cytoplasmatische Fortsätze sollen sich aus dem Zellkörper ausstülpfen und mit den Cytoplasmafäden anderer Osteoblasten anastomosieren (SPULER, 1899). Die Zellen sind in der Lage, diese Ausstülpungen zurückzuziehen und zu bewegen.

Kern:

Der Zellkern ist nach WEIDENREICH (1930) groß, vesikulär, chromatinarm und besitzt 1 bis 3 Nucleoli. CAPPELIN (1948) entdeckte beim Studium der Osteoblasten im Hühnerembryo, daß mit dem Beginn der Ablagerung von Knochenmatrix die Nucleoli hypertrophieren und sich mit R.N.S. beladen, jedoch verschwinden, sobald sich die Zellen zu Osteocyten umwandelten.

Die iuxtanucleäre Vakuole:

Gefärbte, aktive Osteoblasten enthalten in ihrer Mitte eine Vakuole von der Größe des Zellkerns. FELL (1925) konnte zeigen, daß diese Vakuole vorher den Golgiapparat beherbergte, der durch die Fixierung zerstört wurde.

Mitochondrien:

In Studien über die Osteoblastenentwicklung bei der Ratte (PRITCHARD, 1952) fand man, daß die Mitochondrien fadenförmig im Cytoplasma zerstreut liegen, parallel zur Längsachse der Zelle angeordnet. Undifferenzierte Präosteoblasten, reife, inaktive Osteoblasten und Osteocyten enthalten weniger Mitochondrien als aktive Zellen.

Chemie:

Färbbarkeit:

Ein charakteristisches Merkmal des Cytoplasmas ist eine starke Anfärbbarkeit mit basophilen Farbstoffen. Aus der Intensität der Farbaufnahme kann man auf die Aktivität der Osteoblasten schließen. Je stärker die Farbaufnahme, desto größer ist die Aktivität. Die Untersuchung der Knochenentwicklung bei Rattenembryonen ergab, daß mit der Differenzierung vom Präosteoblasten zum Osteoblasten die Anfärbbarkeit zunimmt, jedoch mit der Umwandlung in Osteocyten eine Abnahme der Farbintensität festzustellen ist (PRITCHARD, 1952).

Glykogen:

HARRIS (1949) fand Glykogen in Knorpelzellen und Präosteoblasten, nicht aber in aktiven Osteoblasten. Mit den ersten Anzeichen der Knochenneubildung, wie auch nach experimentell erzeugtem Skorbut, verschwand das Glykogen aus den Zellen (BEVELANDER u. JOHNSON, 1950; 1951). Erst nach Vitamin C-Applikation erschien bei den Skorbutversuchen das Glykogen wieder.

Phosphatase:

Dieses Enzym soll von Osteoblasten und hypertrophischen Knorpelzellen sezerniert werden (MARTLAND u. ROBISON, 1924; FELL u. ROBISON, 1930; 1933). In Versuchen mit Rattenfoeten zeigte PRITCHARD (1952), daß Phosphatase schon im mesenchymalen Gewebe entsteht bevor sich Osteoblasten differenziert hatten. Mit der Verkalkung der Matrix und nach Ausreifung der Osteoblasten ließ die Enzymtätigkeit sofort nach.

Zusammenfassung:

Die Differenzierung zu Osteoblasten beginnt mit dem Erscheinen der alkalischen Phosphatase im Kern und mit Glykogenansammlung im Cytoplasma. Der Golgi-Apparat vergrößert sich, die Mitochondrienzahl nimmt zu und Ribonucleinsäuren (R. N. S.) häufen sich im Cytoplasma an, das in steigendem Maße basophiler wird. Mit dem Auftreten ausgereifter Osteoblasten verschwinden Phosphatase und Glykogen. Der Golgi-Apparat nimmt mehr und mehr die Form von Osteocyten an. Diesen schreibt man eine regulierende Funktion im Stoff- und Mineralumsatz des Knochens zu. Die endgültige Form der Osteoblasten ist entweder die Ursache oder die Folge der Matrixablagerung. Während für LERICHE und POLICARD die endgültige Form eine Degenerationserscheinung darstellt, sind die meisten Forscher der Ansicht, daß der Osteoblast durch aktive Beteiligung an der Matrixbildung seine Endform erreicht habe. Die topographische Beziehung zwischen extrazellulärer Phosphatase und Osteoblasten weist auf die Sekretionsleistung dieser Zellen hin.

Herkunft:

Der Ursprung der Osteoblasten ist noch nicht genügend geklärt. Sie bilden sich aus:

1. Spezifischen Zellen in der Umgebung des Knochens;
2. Bindegewebszellen, die zur Metaplasie befähigt sind und
3. Gefäßendothelzellen: TRUETA nimmt an, daß sich die Osteoblasten von der Gefäßendothelzelle ableiten, die im Augenblick des Mineralisationsvorganges aktiv wird. Der Osteoblast wird durch die Ablagerung anorganischer Substanz in einen Osteocyten verwandelt (TRUETA, 1958).

Funktion:

Aus licht- und elektronenmikroskopischen Studien über aktive Osteoblasten schließt man, daß sie bei der Bildung des Kollagens und der M.P.S. wesentlich beteiligt sind.

d) Die Osteoclasten

ROBIN (1849, 1864) unterschied als erster die Osteoclasten von den Megakaryocyten. KOELLIKER stellte ihre Beziehung zur Knochenresorption fest und nannte sie Osteoclasten.

Größe:

Die Größe der Osteoclasten wird von ihrem Cytoplasmagehalt bestimmt. Nach AREY (1919) nimmt ein Plasmaklumpen ein Volumen von etwa $200,000 \mu^3$ ein. Die Plasmamasse zeigt deutliche Lappchenstruktur, d.h. sie verteilt sich zu kleineren Lappchen, die nur noch durch dünne Plasmafäden in Verbindung stehen (HANCOX, 1949).

Kerne:

Große Osteoclasten besitzen 50 bis 100, mittlere 10 bis 30, kleine 2 bis 3 Kerne mit runder oder ovaler Form.

Cytoplasma:

In dem oxyphilen Cytoplasma (WEIDENREICH, 1930; JAFFE, 1930) liegen zahlreiche Granula verstreut. Möglicherweise sind es Überreste von Mitochondrien (FELL, 1925; HYSLOP, 1952). Je aktiver die Zelle ist, desto mehr Vakuolen enthält das Cytoplasma.

Der Bürstensaum:

Der Bürstensaum ist das hervorstechendste mikroskopische Merkmal der Osteoclasten und liegt meistens dem Knochen eng an. Es hat oft den Anschein, als würden die Fasern des Saums in den Knochen eindringen (Abb. 14; Kap. VIII, S. 243 bei HANCOX in BOURNE). Über den Ursprung des Bürstensaums bestehen verschiedene Meinungen. Während KOELLIKER den Bürstensaum für einen Bestandteil der Zelle hielt, betrachtete ihn POMMER (1883) als ein Produkt des Knochens. Nach POMMER besteht dieser Saum aus kollagenen Faserbündeln, die nach Auflösung der Grundsubstanz im Knochen übrig bleiben. HAM (1952) schloß sich auf Grund vier verschiedener Beobachtungen dieser Auslegung an:

- a) Die Knochenfibrillen sind mit dem Saum identisch;

- b) ein Bürstensaum tritt nur dort auf, wo die kollagenen Fasern des Knochens mit ihrer Längsachse im rechten Winkel zur Knochenoberfläche angeordnet sind;
- c) trotz Abwesenheit von Osteoclasten kommt es an Resorptionsflächen zur Bildung des Bürstensaums;
- d) bei Beobachtung geschrumpfter Osteoclasten in Schnitten hängt der Saum oft am Knochen und nicht an der Zelle.

Gegen Punkt b) spricht, daß der Bürstensaum auch am Knochengewebe zu sehen ist, dessen Fasern parallel zur Oberfläche verlaufen. Die Osteoclastenfortsätze drängen sich zwischen die Knochenfaserbündel und vermögen durch Sekretion eines noch unbekannten Stoffes die Grundsubstanz anzudauen, so daß die kollagenen Fasern sichtbar werden.

Wie geht die Auflösung des Knochens vor sich, wenn der Osteoclast nicht die Ursache, sondern das Ergebnis des Resorptionsvorganges ist?

GAILLARD (1957; 1959) und GOLDBABER (1960; 1961) filmten die Knochenabsorption *in vitro*, wobei man sich bewegende Osteoclasten sehen konnte, die den Knochen auflösten. ARNOLD und JEE (1957) konnten in ihren histologischen Schnitten nachweisen, daß die Osteoclasten einen Teil des Knochengewebes aufgenommen hatten. CAMERON und ROBINSON (1958) entdeckten schließlich Knochenkristalle im Cytoplasma menschlicher Osteoclasten. Einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Osteoclasten und ihrer Funktion liefern die Filmaufnahmen und elektronenmikroskopischen Studien über Osteoclasten von Vogel-embryonen (HANCOX u. BOOTHROYD, 1961). Zu diesem Zweck wurden kleine Stücke embryonischen Stirnbeins in Plasmaklumpchen verpflanzt.

In den Filmaufnahmen besitzen die Zellen einen sich ständig bewegenden Bürstensaum. Diese Bilder vermitteln eine gewisse Vorstellung von der ruhelosen Aktivität an der Zelloberfläche (Abb. 1-3 bei HANCOX, 1961). Die Osteoclasten zeigen eine stark ausgeprägte Pinocytose. Darunter versteht man ein bläschenförmiges Einschleußen von Substanzen in den Zelleib. Die wellenförmige Zellmembran bildet Vakuolen, die in das Zellinnere wandern und sich dort mit anderen Bläschen vereinigen oder sich wieder an die Oberfläche entleerten. Für Pinocytose spricht auch die Tatsache, daß enteiweißtes Knochenpulver, das dem Plasma beigelegt wurde, in den Vakuolen erschien.

In den elektronenmikroskopischen Studien beschreibt HANCOX:

a. Knochenveränderungen:

Die strukturellen Knochenveränderungen waren auf die Matrix, die nahe dem Bürstensaum lag, beschränkt. Zuerst setzte eine Fragmentierung der kollagenen Fasern mit anschließender Loslösung der Knochenkristalle ein. Dieser Verlust

an Kristallen und Grundsubstanz führte zur "Demaskierung" der Fibrillen, wodurch ihre Querstreifung deutlich sichtbar wurde (Abb. 8, 9 und 13 bei HANCOX, 1961).

b. Übergangszone:

In der Übergangszone - das ist der Raum zwischen Bürstensaum und Knochenlagen Kristalle und kollagene Fasern.

c. Cytoplasma:

Zwischen den Cytoplasmafortsätzen waren kollagene Fasern gelagert, die wahrscheinlich im Bereich des Bürstensaums verdaut werden. Die großen Vakuolen des Cytoplasmas sind an der Pinocytose beteiligt und enthalten verkürzte Knochenkristalle. Diese Längenabnahme deutet eine Auflösung der Kristalle an, die wahrscheinlich in den Vakuolen in eine lösliche Form überführt und dann in die extrazelluläre Flüssigkeit ausgeschüttet werden. Weiterhin ist es möglich, daß intrazelluläre Enzyme (ROSE, 1957) in den Vakuolen frei werden und durch Bewegung des Bürstensaums zur Knochenoberfläche gelangen, um auf die Matrix einzuwirken.

Zur Frage der Auflösung der Kristalle und der kollagenen Fasern bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Die Osteoclasten sollen durch Produktion einer Säure die Demineralisation des Knochens einleiten. Die Ansicht, daß die kollagenen Fasern nur nach Abtrennung der Kristalle aufgelöst werden, wird von NEUMAN (1960) unterstützt. Er konnte nachweisen, daß nur die Matrix demineralisierten Knochenpulvers einer Proteolyse unterlag, während die Grundsubstanz mineralhaltigen Pulvers keiner proteolytischen Fermentwirkung ausgesetzt war.

Bezüglich der Herkunft der Osteoclasten besteht die Annahme, daß sie keine eigene Zellart darstellen, sondern daß sie erst auf einen Reiz hin aus präexistierenden Zellen gebildet werden durch:

1. Mitotische oder amitotische Kernteilungen in den Präosteoclasten ohne Plasmateilung,
2. Verschmelzung einkerniger Präosteoclasten.

Solche Präosteoclasten sind embryonale Bindegewebs- oder Reticulumzellen (MORISON, zit. bei HANCOX in BOURNE, Kap. VIII, S. 213, 1956; JACKSON, 1904; BARNICOT, 1941; HELLER, McLEAN u. BLOOM, 1950), Osteoblasten (KOELLIKER, 1873; POMMER, 1883; JORDAN, 1921; AREY, 1919) und Osteocyten (LOEWE, 1879; LEWIS, 1913; TRUETA, 1958).

TRUETA ist der Meinung, daß die Osteocyten, sobald sie aus der Einmauerung

durch Calciumsalze befreit sind, durch Zusammenballung Osteoclasten bilden. Für ihn stellt der Osteoclast die letzte Stufe in der Entwicklungsreihe der Gefäßendothelzellen dar.

3. Hydroxyapatitähnliche Mikrokristalle.

Durch die Anwendung der Röntgendifraktion und des Elektronenmikroskops wurde es ermöglicht, den morphologischen Aufbau des Knochens genauer zu studieren. Die anorganischen Bestandteile bilden Kristallstrukturen. Diese Kristalle entwerfen ein Röntgenstrahlbrechungsgitter, das für die Gruppe der Apatite kennzeichnend ist. Die Kristalle sind sehr klein, wodurch ihr Studium erschwert ist. Nur das Fluorapatit, ein Makrokristall, ist einer genauen Analyse zugänglich. Die empirische Formel eines Fluorapatitkristalls lautet: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ (aus: The Chemical Dynamics of Bone Mineral. NEUMAN, 1958). Analog müßte das Hydroxyapatit, der anorganische Baustein des Knochens, die Formel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ haben.

Über die Kristallstruktur herrschen heute folgende Ansichten:

1. ROBINSON und WATSON (1952) beobachten unbeschädigte Knochenstücke im Elektronenmikroskop und beschreiben die Hydroxyapatitkristalle als dünne Täfelchen von 200 - 300 Å Länge und 20 - 50 Å Breite. Die Kristalle scheinen mit den kollagenen Fasern in Verbindung zu stehen, wobei ihre Längsachsen (=c-Achse) zur c-Achse der kollagenen Fasern parallel liegen. Die Kristalle sind hauptsächlich zwischen den Fasern gelegen. Nur im Dentin sind sie aller Wahrscheinlichkeit nach innerhalb der Faserbündel abgelagert (WATSON u. AVERY, 1954).
2. FINEAN und ENGSTRÖM (1953) meinen aus ihren engwinkeligen Röntgenstrahlstreuungsdiagrammen ersehen zu können, daß Knochenkristalle stabförmige, sechseckige Prismen von 200 - 220 x 40 - 75 Å bilden. Eine Zusammenlagerung von 3 Stäben entspricht nach ENGSTRÖM der Tafelform von ROBINSON.
3. Nach ASCENZI (1955) hat das Knochenmineral die Struktur einer Honigwabe, deren Innenraum von kleinen Kügelchen organischer Substanz, der Grundsubstanz, ausgefüllt sei.

Diese Mikrokristalle spielen wegen ihrer geringen Größe im Stoffwechsel des Knochens eine bedeutende Rolle.

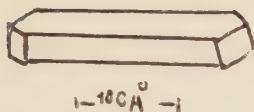


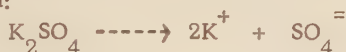
Abb. 1 (Fig. III-7 aus: "The Chemical Dynamics of Bone Mineral" von NEUMAN, S. 54, 1958) zeigt die Struktur eines Knochenkristalls nach ROBINSON und WATSON.

II. Der Stoffwechsel des Knochens.

Der Schlüssel zum Verständnis der Knochenphysiologie und des Elektrolythaushalts ist in den Stoffwechselvorgängen zu suchen. Die extrazellulären Mineralsalze werden auf dem Blutweg in das Knochengewebe transportiert. Das Problem, in welchem chemischen Zustand die Mineralsalze zum Mikrokristall befördert werden, ist mit der Theorie der elektrolytischen Dissoziation von ARRHENIUS zu lösen. Eine Säure, Base oder Salz dissoziiert in Wasser in positiv und negativ geladene Ionen. So dissoziiert NaCl in zwei Ionen:



und K_2SO_4 in drei Ionen:



Zwischen den gelösten Ionen herrschen Anziehungskräfte, deren Größe abhängig ist:

- a) von der Konzentration der verschieden geladenen Ionen;
- b) von der Größe ihrer Ladung (=Valenz).

Nach obigen Beispielen sind auch die Mineralsalze des Blutes in Ionen dissoziiert und bilden ein ziemlich konstantes Löslichkeitsprodukt. Es handelt sich vor allem um Calcium- und Phosphationen. Von großer Wichtigkeit war die Vermutung PRIBRAMS (zit. bei NEUMAN, 1958), daß ein Teil des im Serum befindlichen Calciums an Protein gebunden sei. McLEAN und HASTINGS (1934) erfassen die Beziehung zwischen Calcium und Protein quantitativ. Sie stellten mit Hilfe der "Froschherzmethode" Messungen über die Calciumionenaktivität an und arbeiteten Tabellen mit Dissoziationskonstanten aus, die auf dem Massenwirkungsgesetz gründeten:

$$\frac{[Ca^{++}] \cdot [Protein]}{[Ca \cdot Protein]} = K$$

Man vermutet, daß das Calcium an die Karboxylgruppen des Proteins gebunden wird. Die Ca - bindende Fähigkeit der Proteine beruht auf ihrer Aminosäurezusammensetzung und ist pH - abhängig. Phosphorylierte Proteine zeigen eine spezifische Affinität gegenüber Calcium. Diese Vermutungen werden durch experimentelle Ergebnisse bestätigt. Bei normalem Ca - Serumspiegel binden die Albumine beinahe zweimal soviel Calcium als die Globuline und fast 4 mal soviel wie die γ -Globulinfraktion. Demnach sind etwa 3/4 des an Protein gebundenen Calciums an das Serumalbumin fixiert (Abb. 2).

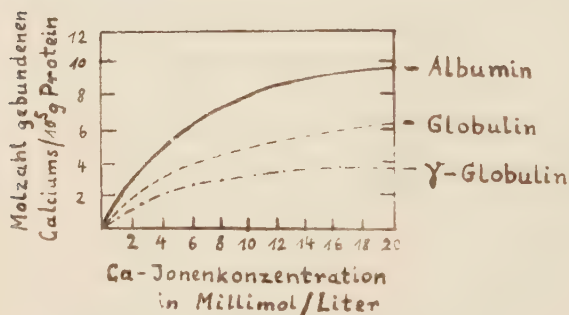


Abb. 2 (aus NEUMAN, S. 14, 1958) zeigt die Bindungswerte des Ca an verschiedene Proteine des Rinderblutes bei pH = 7,4

Das Serumcalcium

Der Normalwert an Calcium beträgt im Serum etwa 2,5 mM/l (=10 mg%) (aus NEUMAN, S. 16, 1958). Davon sind etwa 65% (=1,63 mM/l) ultrafiltrierbar (HOPKINS u. HOWARD, 1952). Von diesem diffusionsfähigen Calcium sind 0,30 mM/l an die löslichen Komplexionen wie Bicarbonat, Phosphat und Citrat gebunden. Somit sind 1,33 mM/l ionisiertes Calcium, welches aktiv am Stoffaustausch teilnimmt (Abb. 3).

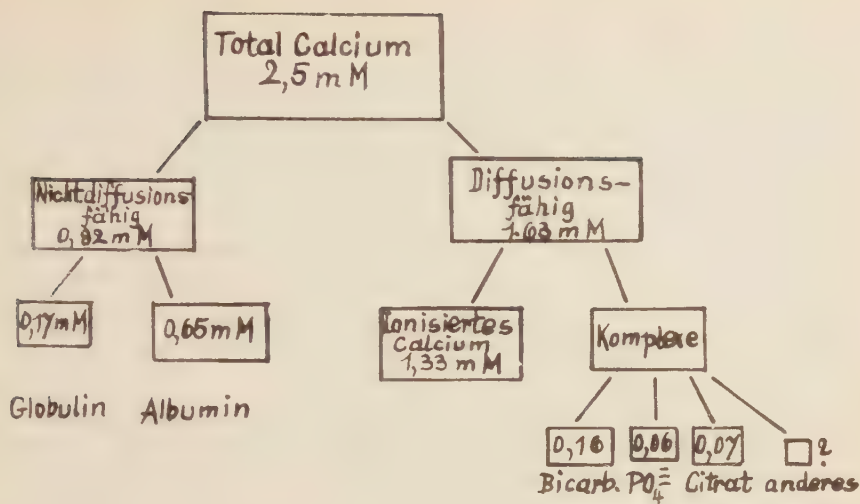


Abb. 3 (aus NEUMAN, S. 18, 1958): Verteilung von Calcium im Serum aus Ultrafiltrationsergebnissen und Bildungskonstanten errechnet.

Das Serumphosphat

Im Gegensatz zum Calcium ist fast sämtliches anorganisches Phosphat in ionisiertem Zustand vorhanden. Als Normalwert für das gesamte anorganische Phosphat im Serum werden etwa 3,1 - 6,2 mg% angegeben, wobei aber noch erwähnt sei, daß die Phosphatkonzentration vom jeweiligen Alter und von der Stoffwechsellaage abhängig ist.

1. Oberflächenchemie

Bei allen Stoffwechselvorgängen im Knochen spielt die Kristalloberfläche eine entscheidende Rolle. Jedes Kristall besitzt an seiner Oberfläche eine "elektrostatistische Asymmetrie", die folgendermaßen entsteht:

Im Innern des Kristallgitters ist jedes Kation von Anionen und jedes Anion wiederum von Kationen umgeben. Die Ionen der Kristalloberfläche sind jedoch nur an drei Seiten von entgegengesetzt geladenen Ionen besetzt, wodurch ein Netzwerk positiver und negativer Restladungen entsteht. Die positiv und negativ geladenen Ionen erzeugen an der Oberfläche elektrische Kräfte, die eine Schicht hydratisierter Ionen, die sog. Hydratationsschale an sich bin-

den, Beispielsweise binden synthetische Apartite 0,8 g Wasser/pro g Kristall (NEUMAN, TORIBARA u. MULRYAN, 1953).

Alle Ionen, die am Stoffwechselgeschehen beteiligt sind, müssen diese Schale passieren. Die Kenntnisse über den Ionentransport wurden durch Anwendung radioaktiver Ionen erweitert. Ein gelöstes Ion kann von der Lösung (I in Abb. 4) durch Diffusion in die zwei äußeren Schichten (II in Abb. 4) der Hydratationsschale eindringen (STOLL u. NEUMAN, 1956). An der Kristalloberfläche liegt eine Schicht hydrierter Calcium-, Phosphat- und Hydroxylionen (III in Abb. 4), die mit den oberflächennah gelegenen Ionen (IV in Abb. 4) des Kristallgitters im Austausch stehen. Sind freie Valenzen im Gitter vorhanden, so findet auch ein intrakristalliner Ionenaustausch statt (V in Abb. 4). Ein Ion kann somit an 3 Vorgängen beteiligt sein:

- a) An der Diffusion von der Lösung in die Hydratationsschale ($I \rightarrow II \rightarrow III$);
- b) am Austausch zwischen Oberfläche und hydrierter Ionenschicht ($III \leftrightarrow IV$);
- c) am intrakristallinen Austausch ($IV \leftrightarrow V$ in Abb. 4).

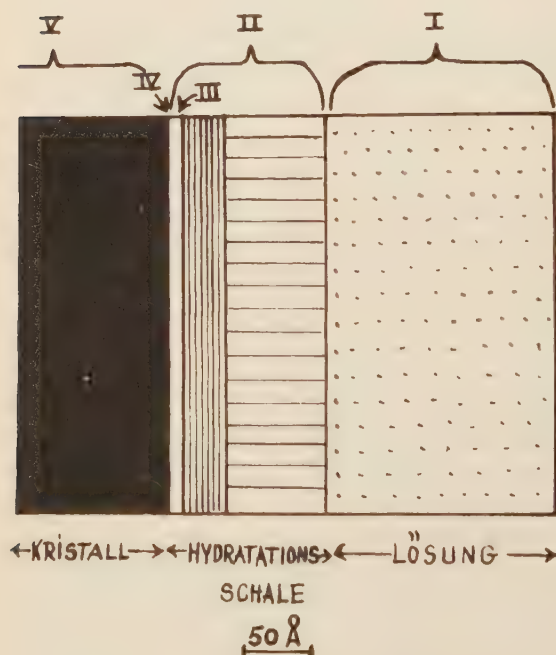
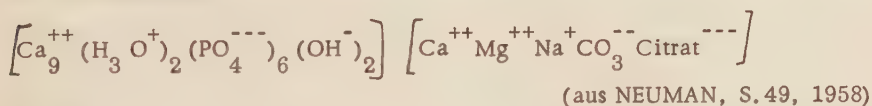


Abb. 4: Darstellung der zwischen Lösung (I) und Kristallinnerem (V) gelegenen Hydratationsschale (II), die aus 3 Schichten besteht (Schicht leicht gebundenen Wassers, Schicht hydrierter Ionen (III in Abb. 4). (aus NEUMAN, 1957, Sonderdruck Titel siehe Lit. -Verz.).

Der Ionenaustausch zwischen Lösung und Hydratationsschale ($I \leftrightarrow II$ in Abb. 4) sowie zwischen letzterer und Kristalloberfläche (IV in Abb. 4) erfolgt relativ schnell, während der intrakristalline Transport langsamer vor sich geht und von freien Gittervalenzen abhängig ist. Im Organismus sind die Kristalle von einer verschiedene Ionen enthaltenden Lösung umgeben. Je nach ihrer Reaktionsfähigkeit in den einzelnen Schichten kann man die Ionen in vier Gruppen aufgliedern:

- α) Ionen, welche in die Hydratationsschale diffundieren, ohne sich dort zu konzentrieren, z.B. K^+ , Na^+ , Cl^- ;
- β) Ionen, die sich in der Hydratationsschale konzentrieren, z.B. Mg^{++} , Sr^{++} , Ra^{++} , UO_2^{++} , CO_3^{--} ;
- γ) Ionen, die nach Konzentration in der Hydratationsschale andere Ionen der Kristalloberfläche ersetzen, z.B. Sr^{++} , Ra^{++} , Na^+ , F^- ;
- δ) Ionen, welche Gitterionen der Oberfläche wie auch des Kristallinneren verdrängen können, z.B. Sr^{++} , Ra^{++} , F^- (aus NEUMAN, S. 83. 1958).

Infolge der Reaktionsfähigkeit mit den verschiedensten Ionen ist das Knochenkristall ein relativ unreines Hydroxyapatit, das 6% Carbonat, 1% Citrat, 0,7% Na, 0,7% Mg und Spuren von Fluor enthält. Da ein Teil des Calciums zur Neutralisation, besonders des Carbonats, benötigt wird, lautet die Zusammensetzung des Knochenkristalls:



Nach dieser Ionenaustauschtheorie bestehen enge Beziehungen zwischen Kristall und Serum. So spiegelt z.B. der Carbonatgehalt des Knochens das CO_3^{--}/HPO_4^{--} -Verhältnis im Serum wieder. Eine weitere Besonderheit der Mikrokristalle ist die Abhängigkeit ihrer Löslichkeit von ihrer Größe und Zusammensetzung.

Die bereits beschriebenen Vorgänge, wie Diffusion in die Hydratationsschale, Ionenaustausch an der Oberfläche und Rekristallisation im Innern finden auch im Organismus statt, nur sind sie hier physiologischer Bedingungen wegen modifiziert. Die passiven, physikalisch-chemischen Vorgänge werden von aktiven Prozessen, wie Wachstum und Resorption des Knochens überlagert. Das Alter der Osteone bestimmt ihre chemische Aktivität. Neugebildete Kristalle binden viel Wasser, sind äußerst unbeständig und fast alle ihre Ionen können sehr schnell durch andere ersetzt werden (NEUMAN, 1950; ZETTERSTRÖM, 1952). Mit zunehmendem Alter der Osteone werden die Kristalle größer, binden weniger Wasser und erreichen eine gewisse Stabilität im Innern; die Diffusion,

der Ionenaustausch und die Rekristallisation sind verringert.

Die Osteone scheinen sehr schnell auf 90% ihres maximalen Mineralgehalts zu verkalken (AMPRINO u. ENGSTRÖM, 1952). Die restliche Verkalkung vollzieht sich trotz Übersättigung der zirkulierenden Flüssigkeiten an Ca^{++} - und HPO_4^{--} -Ionen relativ langsam. Zu Beginn der Kalkablagerung ist wenig freies Wasser vorhanden und der Ionentransport verlangsamt. Nach vollständiger Mineralisation tritt ein Stillstand der physiologisch-chemischen Reaktionen ein. Warum jedoch sind die Osteone des ausgewachsenen Skeletts trotzdem am Stoffwechsel beteiligt? Der Grund hierfür ist der ständige Um- und Abbau alter und der Anbau neuer Havers'scher Systeme.

2. Der Varkalkungsprozeß

2a. DIE NUKLEATIONSTHEORIE

In den letzten Jahren wurden die Vorgänge der biologischen Mineralisation teilweise geklärt. Man erkannte, daß die extrazellulären Flüssigkeiten mit Knochenmineralien übersättigt sind. Sobald die Kristallbildung eingesetzt habe, gewährleiste der Gehalt an Calcium-, anorganischen Phosphat- und Hydroxylionen das Wachstum der Knochenkristalle. Irgendein Antrieb ist zur initialen Kristallisation erforderlich (NEUMAN, 1958).

ROYER (1928) prägte den Begriff "epitaxy", um damit das Phänomen des crystalline intergrowth oder oriented overgrowth zu beschreiben. Seeding-mechanism oder Kristallnukleation sind neuere Bezeichnungen für den gleichen Vorgang. Eine Zustandsänderung, die mit der Bildung einer neuen, stabileren Phase einhergeht, wird Nukleation genannt. Die Eisbildung aus Wasser oder die Wasserbildung aus Dampf sind allgemeine Beispiele für eine Zustandsänderung. Ausschlaggebend für das Verständnis solcher Phänomene sind die Gleichgewichtsverhältnisse der Systeme und deren Beziehung zur Stabilität. GIBBS (zit. bei GLIMCHER in: Calcification in Biological Systems, S. 424, 1960) beschreibt 4 Gleichgewichtsarten, das stabile, neutrale, unstabile und metastabile Gleichgewicht.

Diese Gleichgewichtsarten können anhand vier mechanischer Modelle erklärt werden:

Eine Kugel befindet sich am Boden eines Bechers im stabilen Gleichgewicht, da sie nach allen möglichen Veränderungen immer wieder in ihre ursprüngliche Lage zurückkehrt (Abb. 5, a). Dieses Beispiel soll zeigen, daß eine Zustandsänderung in Lösungen mit stabilem Gleichgewicht nur durch eine völlige Änderung des Systems zu erreichen ist (wie

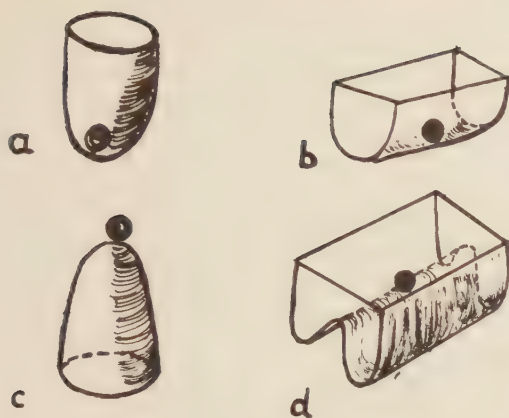


Abb. 5 (aus GLIMCHER in "Calcification in Biological Systems", S. 424, 1960): Mechanische Modelle zur Darstellung der vier Gleichgewichtsarten stabil (a), neutral (b), unstabil (c) und metastabil (d).

z.B. durch Umkippen des Bechers oder Herausnehmen der Kugel). Systeme mit neutralem Gleichgewicht sind ebenfalls stabil, da die Kugel ohne Einwirkung irgendwelcher Kräfte an einem bestimmten Platz der Rinne liegen bleibt. Erst unter Einwirkung äußerer Kräfte verändert sie ihre Lage und kann mehrere Positionen am Boden der Rinne einnehmen, ohne in die Ausgangslage zurückkehren zu müssen (Abb. 5, b).

Im Falle unstabilen Gleichgewichts (Abb. 5, c) führen die geringsten Anlässe zu Lageveränderungen, Lösungen, die sich in diesem Gleichgewichtszustand befinden, werden nicht sehr lange beständig sein.

Bei metastabilem Gleichgewicht (Abb. 5, d) herrscht eine gewisse Stabilität. Rolllt man die Kugel in die höher gelegene Rinne, so nimmt sie einen stabilen Gleichgewichtszustand ein, trotzdem ist aber auch eine Zustandsänderung z.B. durch Rollen der Kugel in die tiefer liegende Rinne möglich.

Das metastabile Gleichgewicht ist für den Kristallisationsvorgang von besonderer Bedeutung. So kann nämlich in metastabilen Lösungen unter geeigneten Bedingungen eine Zustandsänderung herbeigeführt werden, ohne die Eigenschaften des Systems wesentlich zu verändern. Eine Zustandsänderung, die mit der Bildung von Kristallkernen in einer Flüssigkeit einhergeht, wird Nukleation genannt. Es gibt eine homo- und heterogene Nukleation. Unter homogener Nukleation versteht man die Bildung eines neuen Zustandes in einer metastabilen Lösung, die keine Fremdkristalleinschlüsse enthält. Als Beispiel kann die

Eisbildung aus Wasser dienen. Wird Wasser von allen korpuskulären Bestandteilen befreit und auf -39°C abgekühlt, so formen sich Eiskristalle (SCHAEFER, 1949); werden dem Wasser jedoch AgI-Kristalle beigemischt, so kommt es schon bei -4°C zur Eisbildung (=heterogene Nukleation). Die AgI-Kristalle stellen gewissermaßen Katalysatoren dar, welche die Nukleation auslösen (TURNBULL, 1950; 1952).

Seit der Erkenntnis, daß die Mineralionen der Knochenkristalle aus den Körperflüssigkeiten stammen und daß in dieser Flüssigkeit normalerweise keine spontane Präzipitation abläuft, fordert man einen Mechanismus im verkalkenden Gewebe, der die Kristallbildung auslöst. CAGLIOTI wies auf die Bedeutung der kollagenen Fasern für die Kristallisation hin; denn elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß die Längsachse der Kristalle parallel der Faserlängsachse liegt (FINEAN u. ENGSTRÖM, 1953; ROBINSON u. WATSON, 1952; CAGLIOTI, ASCENZI u. SANTORO, 1956). Weiterhin erkannte man, daß die Kristalle in der Grundsubstanz zwischen den kollagenen Fasern liegen (ROBINSON u. WATSON, 1952; GLIMCHER, 1957; 1960). An Faserquerschnitten des Dentins konnten die Kristalle innerhalb der kollagenen Faserbündel nachgewiesen werden (WATSON u. AVERY, 1954). Die Makromoleküle der kollagenen Fasern bilden eine Gitterstruktur, welche als Katalysator wirken und die Bildung kleiner Kristallkerne auslösen soll. Für die Kristall-induzierende Eigenschaft des Kollagens gibt es drei Theorien:

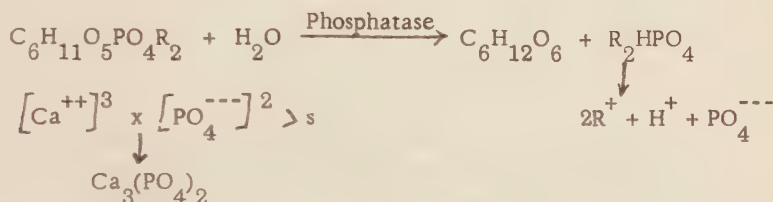
- 1) Auslösung der Nukleation durch einen phosphorylierten Aminosucker im Fasermolekül des Kollagens (NEUMAN u. NEUMAN, 1953; DISTEFANO, NEUMAN u. ROUSER, 1953);
- 2) Aktivierung des Proteins im Knorpel durch enzymatische Übertragung einer Pyrophosphatgruppe des ATP auf das Protein (CARTIER u. PICARD, 1955);
- 3) Komplexbindung zwischen Kollagen und Chondroitinsulfat durch das Nukleationszentrum im Knorpel (SOBEL u. BURGER, 1954).

Diese drei Theorien stimmen darin überein, daß Protein ein Faktor bei der Verkalkung ist und daß das Proteingitter Calciumionen in einer bestimmten räumlichen Anordnung bindet. Im Organismus erfolgt die Verkalkung des Osteoids gleich nach seiner Entstehung, während bei der Mineralisation des Knorpels eine latente Periode festzustellen ist. Möglicherweise handelt es sich hier um zwei verschiedene Vorgänge. Vielleicht bedarf das Knorpelkollagen im Gegensatz zur kollagenen Faser des Knochens eines besonderen "Antriebsmechanismus".

2b. DIE PHOSPHATASETHEORIE

Die Ferment-Theorie von ROBISON' (1932) erklärte den Verkalkungsprozeß folgendermaßen:

Ein Substrat, z. B. Hexosemonophosphat, wird unter dem Einfluß des Enzyms Phosphatase hydrolysiert, um eine hohe, lokale Phosphationenkonzentration zu erzeugen, welche das Produkt der Löslichkeitskonstanten überschreitet. Nach Überschreiten des kritischen Ionenprodukts $[Ca^{++}]^3 \times [PO_4^{---}]^2 > s$ kommt es bei Anwesenheit von Calciumionen zur Präzipitation. Zur besseren Erläuterung sei das Verkalkungsschema nach Robison (bei BOURNE in BOURNE, Kap. IX, S. 252, 1956) angeführt.



ROBISON ist der Ansicht, daß die Phosphatase von Osteoblasten und hypertrophischen Knorpelzellen produziert wird. Der Fehler ROBISONs liegt in der Annahme, daß eine Erhöhung der Ionenkonzentration zur Verkalkung nötig ist. Neuerdings wird der Phosphatase eine ganz neue Funktion bei der Kalzifikation von Kollagen zugeschrieben. FLEISCH und NEUMAN (1961) zeigten, daß ein Plasmaultrafiltrat ein oder mehrere Substanzen enthält, welche die Calciumphosphatkristallisation hemmen. Dieser im Plasma vorhandene Inhibitor, der vielleicht ein Polyphosphat ist, wird durch die alkalische Phosphatase inaktiviert. FLEISCH und BISAZ (1961) konnten den Hemmstoff der Kalzifikation auch im Urin nachweisen. Es handelt sich ihrer Ansicht nach um einen Pyro- oder Triphosphorsäureester, der die Verkalkung hemmt, indem er das normale Produkt von $Ca \times P$ erhöht.

2c. ANDERE EINFLÜSSE AUF DEN VERKALKUNGSVORGANG

Generalisierte Knochenerkrankungen wie z. B. der Morbus Recklinghausen oder die Rachitis deuten den Einfluß des Parathormons der Nebenschilddrüsen und des Vitamin D auf die Verkalkung an. Das Parathormon und das Vitamin D wirken regulierend auf den Calciumserumspiegel ein.

BARNICOT (1948) konnte nachweisen, daß es nach Transplantation parathyreoiden Gewebes zur Auflösung von Knochensubstanz kam. Welche Rolle die Zellen

bei der Mineralisation spielen, ist noch nicht genügend geklärt. Jedenfalls sollen die Osteoblasten für die Bildung des Kollagens und der M.P.S. verantwortlich sein (JACKSON, 1960; PRITCHARD, 1956). Gegenwärtig besteht die Annahme, daß die Osteocyten unter dem Stimulus des Parathormons zu einer lokalen Produktion von Zitronensäure angeregt werden (ELLIOT u. FREEMAN, 1956). Wahrscheinlich besteht zwischen dem Citrat- und Calciumstoffwechsel ein enger Zusammenhang.

Wenn auch die letzten Einblicke in den Verkalkungsvorgang bis heute verborgen sind, so sprechen doch die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den kollagenen Fasern und den Apatitkristallen sowie die parallele Anlagerung der Kristallängsachse an die Längsachse der Faser mit großer Wahrscheinlichkeit für die Nukleationstheorie.

III. Allergie und Transplantation

Das Wort Allergie stammt von PIRQUET. Er definierte: "Allergie ist die veränderte Reaktionsfähigkeit, welche der menschliche Organismus durch das Überstehen einer Krankheit oder durch Vorbehandlung mit körperfremden Substanzen erwirbt" (zit. aus PIRQUET, 1904).

Die historischen Grundversuche über die Auslösung einer immunologischen Reaktion führten RICHET und PORTIER (1904) durch. Sie injizierten Hunden, die etwa 14 Tage vorher parenteral mit Aktinientoxin vorbehandelt worden waren abermals kleine Mengen des gleichen Giftes, woraufhin die Tiere nach wenigen Minuten unter Schocksymptomen starben. RICHET nannte diese Erscheinung Anaphylaxie. Er deutete den Schock als Folge einer durch die erste Injektion hervorgerufenen, spezifischen Sensibilisierung, d. h. die parenterale Applikation eines artfremden Eiweißkomplexes bewirkt im Empfänger die Bildung von Antikörpern, die nach erneuter Berührung mit dem gleichen Antigen eine Antigen-Antikörperreaktion auslösen.

Für die antigene Wirkung der Eiweißkörper sind die aromatischen Aminosäuren von besonderer Bedeutung. Erst später zeigte sich, daß auch eiweißfreie Stoffe antigen wirksam sind, sobald sie an Eiweiß gebunden werden. Diese Antigene werden als **Haptene** bezeichnet.

Die Antikörper sind als modifizierte Globuline anzusehen und werden im RES, in Reticulum- und Plasmazellen sowie in der Leber gebildet. Die Antikörper kommen wahrscheinlich in der Weise zustande, daß die Antigene oder deren aktive Fragmente in die Globulinbildungsstätten eindringen und dort die Synthese spezifischer Antikörper aus Globulinen bewirken (BREINL u. HAURO-

WITZ, 1937; PAULING u. MITARB., 1942). Neben dieser anaphylaktischen Reaktion, die unter Schocksymptomen zum Tode führt, entdeckte ARTHUS (1903) die lokale Anaphylaxie. Er wies nach, daß ein sensibilisiertes Kaninchen nach subcutaner Injektion des Antigens mit entzündlichen Infiltraten, Nekrose und Hautangrän an der Injektionsstelle reagiert. Das Antigen bewirkt eine Gefäßreaktion in Form einer serösen Stase; anschließend kommt es zum Zellaustritt, wobei sich oft bis zu 50% Eosinophile finden. Nachdem die Existenz der verschiedensten Antigene bewiesen war, lag die Vermutung nahe, die Ursache für das schlechtere Einheilen homoio- und heteroplastischen Gewebes in einer veränderten Reaktionslage des Wirts zu suchen. Das Eiweiß des homoioplastischen Spans scheint auf das Wirtsgewebe als Antigen zu wirken. Die Grundlagen auf dem Gebiete der Transplantationsimmunität wurden durch homoioplastische Hautverpflanzungen gelegt (MEDAWAR, 1958; BRENT, 1958; LAWRENCE, 1959). MEDAWAR beobachtete, daß homoioplastische Hauttransplantate zunächst durch regelrechten Gefäßkontakt mit dem Wirtsgewebe anheilen, sich aber nach 10-12 Tagen wieder ablösen. Diese stets wiederkehrende Latenzzeit von 10 - 12 Tagen ließ immunologische Vorgänge vermuten, vor allem als sich zeigte, daß ein zweites Transplantat offenbar aufgrund der vorhergegangenen Sensibilisierung durch die erste Verpflanzung nach einer verkürzten Latenzzeit unter einer heftigen Antigen-Antikörperreaktion abgestoßen wird. Mit der Einführung der Knochenbank (INCLAN, 1942) fand der homoio- und heteroplastische Span vielseitige Verwendung in der Knochenchirurgie. Die Frage, ob und welche immunologischen Reaktionen sich bei der homoioplastischen Knochenverpflanzung abspielten, schenkte man bislang wenig Aufmerksamkeit. Die schlechteren klinischen Ergebnisse der Homoioplastik im Vergleich zur Autoplastik und die Theorie der Gewebsimmunität (GIBSON u. MEDAWAR, 1943; MEDAWAR, 1944) deuteten jedoch auf einen Zusammenhang zwischen homoioplastischer Transplantation und Abwehrreaktion vonseiten des Wirts hin.

CHALMERS (1959) verpflanzt frische auto- und homoioplastische Späne in die paravertebrale Muskulatur von Ratten und studiert das Verhalten homoioplastischer Späne nach vorhergegangener, homologer Hauttransplantation vom gleichen Spender. Er kommt zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Frische Autoplastik gibt 4 Tage nach der Transplantation Anlaß zur Knochenneubildung.
- 2) Frische Homoioplastik erbringt 2 Phasen von Knochenneubildung, eine frühe und eine späte Phase.

Der neue Knochen der frühen Phase erschien etwa 4 Tage nach der Transplantation und starb am 8. Tag wieder ab. Für CHALMERS ist der Untergang dieses neuen Knochens ein Beweis für eine immunologische Reaktion im Wirtsgewebe.

Er ist der Ansicht, daß überlebende Osteocyten des Spans während der Latenzzeit genügend Zeit haben, neuen Knochen zu bilden und daß mit Beginn der Antigen-Antikörperreaktion der Abbau des neuen Knochengewebes einsetzt.

Der Knochen der späten Phase entwickelte sich erst 4 Wochen nach der Transplantation, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Entzündungsreaktion ihren Höhepunkt schon überschritten hatte. Nach den Ergebnissen von CHALMERS spricht für eine Antigen-Antikörperreaktion

- a) die Knochenneubildung der frühen Phase und ihr Untergang;
- b) die heftigere Entzündungsreaktion und die mangelnde Knochenbildung nach Sensibilisierung des Tieres durch eine vorhergegangene Hauttransplantation;
- c) die Zunahme des Bindegewebes und die Infiltration von Lymphocyten, Plasmazellen, Eosinophilen und Histiocyten um den 8. Tag post transplantationem;
- d) gefrorene homoioplastische Späne riefen eine geringere Entzündungsreaktion hervor als frische Homoioplastik.

KIENHOLZ und KEMKES (1956) konnten in ihren Versuchen zeigen, daß Kaninchen durch Implantation gefriergetrockneten, eiweißhaltigen Rinderknochens gegen Rindereiweiß sensibilisiert werden. Eine 3 Wochen nach der intraglutaealen Knochenimplantation erfolgende intravenöse Injektion von $1,8 \text{ cm}^3$ Rinderserum löste je nach Größe des Spans einen tödlichen Schock aus. Ein Knochenstück von 2 cm^3 führte zum Schock, während 1 cm^3 große Späne keine anaphylaktische Reaktion auslösten (Gesetz der "high dosage" und "low dosage" nach MEDAWAR).

Die "Isoantigene" der homoioplastischen Späne, die im Wirtsgewebe eine allergische Reaktion entfachen, teilt MEDAWAR (1959) in zwei Gruppen ein, in H-Antigene und T-Antigene.

Die H-Antigene sind zur Bindung humoraler Antikörper befähigt und im Gewebe weit verbreitet. Viele Versuche wurden unternommen, um im Serum kreisende Antikörper zu entdecken. BURWELL (1961) konnte bei Kaninchen nach Injektion eines Knochenextraktes keine Serumantikörper nachweisen. Ebenso war es CURTISS, POWELL und HERNDON (1959) nicht möglich, nach homoioplastischer Spanverpflanzung bei Kaninchen eine deutliche Veränderung des Properdiniters zu finden. Heterologe Hautextrakte riefen in Kaninchen zellschädigende Antikörper und Präzipitine hervor (ALLGÖWER u. Mitarb., 1952). MERRILL (1959) erhielt nach subcutaner Injektion menschlicher Leukocyten im Kaninchen-serum Cyttoxine und Präcipitine. Andererseits konnten im Serum von Hamstern nach mehrmaliger Injektion von Rattenknochenextrakten keine Antikörper nach-

gewiesen werden (SIEGRIST u. ENNEKING, 1960). BURWELL (1961) gelang bei 10 Mäusen nach wiederholter Injektion eines Kaninchenknochenextraktes der Nachweis von Präcipitinen und Hämagglutininen, die sich gegen die Eiweiß- und Polysaccharidfraktionen des Extraktes gebildet hatten.

Die T-Antigene bilden an Zellen gebundene Antikörper und zeichnen sich durch Entfaltung einer Transplantationsimmunität aus. BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR (1956) zeigten erstmals, daß die Antigene DNS - Proteinkomplexe sind.

SURWELL (1962) untersuchte bei 97 Kaninchen die antigenbildende Fähigkeit homoioplastischer Spongiosaspäne und stellte fest, daß

1. die Antigene zum größten Teil im roten Knochenmark lokalisiert,
2. die weichen Bestandteile der Spongiosa "antigenaktiver" als die Compacta sind (WEINBERG, MAKIN, NELKEN u. GUREVITCH, 1959),
3. Kochen und Gefriertrocknen markhaltiger Spongiosaspäne die antigenen Eigenschaften verringert.

Man ist heute der Ansicht, daß die Träger der Transplantationsimmunität nicht Serumantikörper, sondern an Zellen der lymphatischen Reihe gebundene Antikörper sind (MEDAWAR, 1959). Der erste histologische Bericht über die Produktion von antikörperbindenden Zellen in regionalen Lymphknoten nach homoioplastischer Spanimplantation stammt von GALLONE, RADICI und RIGNIER (1952). SCOTHORNE und MCGREGOR (1955) führten die Bezeichnung "large lymphoid cell" ein und beschrieben damit eine Zellart, die in der Rinde von Lymphknoten gebildet wird. BURWELL konnte diesen Befund nach homoioplastischer Spanverpflanzung im Kaninchen bestärken (BURWELL, 1961). Der Höhepunkt der lymphatischen Zellreaktion ist am 5. Tag nach der Transplantation erreicht (BURWELL, 1961). Der Ursprung dieser großen lymphatischen Zellen ist bis jetzt noch nicht geklärt. FAGRAEUS (1948) bezeichnet die reticuloendothelialen Zellen als Stammzellen der Antikörperbildung, während MARSHALL und WHITE (1950) den undifferenzierten Mesenchymzellen den Vorzug geben. Andere vermuten, daß die kleinen Lymphocyten aus den großen lymphatischen Zellen hervorgehen (EHRICH, 1929; RICH u. Mitarb., 1939; HARRIS u. HARRIS, 1949; UNNO u. Mitarb., 1954).

Das Aufhören der Knochenneubildung und Abbau dieses Knochens zum Zeitpunkt der größten lymphatischen Infiltration in das Spanbett scheint ein Beweis für die Beteiligung der kleinen Lymphocyten an der allergischen Reaktion zu sein. Die Versuche von ALGIRE (1954) bestätigen die Wichtigkeit der Lympho-

cyten bei der Resorption eines homoioplastischen Spans. Er konnte nachweisen, daß homoioplastische Späne, die von einer für diese Lymphocyten undurchlässigen Membran umgeben waren, länger überlebten. Die Membran ließ zwar die Antigene des Spans durchtreten, hielt aber die an Lymphocyten gebundenen Antikörper zurück. Dadurch wurde die Überlebenszeit der Spanosteocyten im Schutze der Membran deutlich verlängert.

Zur Beurteilung der "antigenen Kraft" homoioplastischer Späne sind 5 Methoden anwendbar:

1. Der serologische Nachweis zirkulierender Antikörper.
2. Die Entzündungsreaktion am Transplantationsort ist Ausdruck der immunologischen Reaktion des Wirts gegenüber dem Span. Die lokale Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch:
 - a. Zelleinwanderung (Eosinophile, Mastzellen, Lymphocyten),
 - b. Bindegewebsvermehrung,
 - c. Gefäßreaktionen: Zugrundegehen alter und neuer Kapillaren;
 - d. Degeneration des Spans,
 - e. Abbau des neuen Knochens
3. Die Sensibilisierung:

Homoioplastische Hauttransplantate werden schneller abgestoßen, wenn das Tier durch eine vorhergegangene Spanimplantation sensibilisiert worden war (CHALMERS, 1959).
4. Die Produktion großer, lymphatischer Zellen in den Lymphknoten.
5. Der Zustand einer immunologischen Toleranz gegenüber dem Span von seiten des Wirts ist ein Indikator zur Abschätzung der antigenen Kraft eines Transplantates (NISBET, ZEISS u. HESLOP, 1960)

Dieses Kapitel über die Anatomie und Physiologie des Knochengewebes sollte den heutigen Stand der modernen Osteologie kurz zusammenfassen und klarmachen, daß der Knochen nicht nur eine Stützfunktion besitzt, sondern daß er aktiv am Stoffwechselgeschehen teilnimmt.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

PROBLEMSTELLUNG

Das Ziel dieser tierexperimentellen Versuche sollte es sein, das Verhalten auto-, homoio-, und heteroplastischer Späne im Knochenlager einer vergleichenden, histologischen Betrachtung zu unterziehen. Dabei sollten folgende Punkte besonders untersucht werden:

1. Zeitlicher Ablauf des Einbaus der 3 Spanarten;
2. Reaktion des Wirtslagers auf die 3 Spantypen;
3. Art, Menge, Lokalisation des neuen Knochens.

VERSUCHSBESCHREIBUNG

Auf der Suche nach einem einfachen Modell wählten wir Ratten, weil diese die Einbauverhältnisse am übersichtlichsten zeigen. Bei Hunden kann man das Geschehen am Transplantationsort nicht so genau überblicken, da immer nur einzelne Bildsegmente histologisch untersucht werden können, während bei der Ratte das ganze Lager samt Transplantat in einem Bildausschnitt zu übersehen ist.

- 1) Versuchsmaterial: Als Versuchstiere dienten weiße, erwachsene Ratten der Sprague - Dawley - Rasse beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250 - 300 g.

Die homoioplastischen Späne wurden aus den Femora von Wistar - Ratten gewonnen und in einer Tiefkühltruhe bei einer Temperatur von -20°C bis zu 2 Monaten aufbewahrt. Die kürzeste Aufbewahrungszeit betrug 10 Tage.

Bei den heteroplastischen Transplantationen fand der "Kieler Span" (Fa. BRAUN, Melsungen) Verwendung.

- 2) Versuchsdauer: Die Versuchstiere wurden in Zeitabständen von 8 Tagen, 16 Tagen, 3 Wochen, 6 Wochen, 3, 4 1/2 und 6 Monaten post transplantationem getötet.
- 3) Futter: Zur Untersuchung des Strontiumeinflusses auf die Knochenneubildung wurde einer Gruppe von Ratten auf

100 g Normalfutter 7,5 g SrCl_2 beigemengt. Die zweite Gruppe erhielt normales Standardfutter.

- 4) Allergie-Ratten: Zum Studium der verschiedenen immunologischen Reaktionen wurden gefrorene, homoioplastische Späne zu zwei verschiedenen Zeitpunkten verpflanzt. Vierzehn Tage nach der 1. Transplantation in den rechten Femur fand die 2. Verpflanzung des gleichen Spanmaterials in die linke Femurdiaphyse statt. Weitere 14 Tage nach dieser 2. Operation wurden die Tiere getötet. Kontrollversuche wurden mit auto- und heteroplastischen Spänen durchgeführt.

- 5) Technik: Unter Äthernarkose wurde aus dem freigelegten Femur ein etwa 3 - 4 mm langes Knochenstück mit Hilfe eines Lüers herausgezwickelt, wobei der Markraum eröffnet wurde. Bei der Autoplastik pflanzten wir in einer Sitzung den aus dem rechten Femur entnommenen Span in das linke und den links entnommenen in das rechte Knochenlager ein.

Die gefrorenen, homoioplastischen Späne wurden vor der Transplantation in erwärmter, physiologischer Kochsalzlösung aufgetaut. Eine zirkulär um den Femur geknüpfte Schlinge aus feinstem Seidenfaden befestigte den Span im Transplantationsbett. Diese Technik verwendeten wir bei den "Langüberlebenden" (4 1/2; 6 Monate).

Da mit dem Lüer nicht immer ein gleich großes Stück entnommen werden konnte und es wegen Splitterung des übrigen Femurs in Längsrichtung oftmals zu Ermüdungsbrüchen kam, änderten wir die Technik folgendermaßen:

Mit einem spitzen Skalpell wurden in die Diaphyse des Femur in Längsrichtung 2 stecknadelkopfgroße Löcher im Abstand von 3 bis 4 mm gebohrt und das zwischen den Bohrlöchern liegende Stück herausgehoben. Wir verwendeten absichtlich keinen elektrischen Bohrer, um die infolge der hohen Umdrehungszahl unvermeidlichen Hitzeschäden zu umgehen. Zwei Catgutnähte in der Schenkelmuskulatur und vier Hautnähte verschlossen die Wunde.

Injektionsmethode:

Nach Einschläfern mit Äther injizierten wir dem toten Tier etwa 7 ccm eines

Gemisches aus Mikropaque (disperses Bariumpulver) und Aqua dest. (Mischungsverhältnis : 40 Teile Mikropaque; 60 Teilen Aqua dest.) nach Eröffnung des Abdomens in die Bauchaorta. Die Methode diente zur Darstellung der Gefäße im Operationsgebiet.

Fixierung:

Die Oberschenkel wurden in 5%igem säurefreien Formalin fixiert und in neutralem Titriplex III (=Äthylendiamintetraessigsäure) entkalkt.

Einbettung:

In Methylnmetacrylat. - Herstellung 4 μ dicker Schnitte.

Färbung: Azur - Eosin (nach BURKHARDT).

Histologische Befunde

1) 8 Tage nach der Transplantation:

a. Frische Autoplastik

Präparat (A 36):

Von den markseitigen Bruchenden des Wirtsknochens und der markseitigen Fläche des Transplantats geht eine lebhaftige Knochenneubildung aus. Auffallenderweise sind nach 8 Tagen die neuen Knochenbälkchen auf das Gebiet unterhalb des Transplantats beschränkt und schließen mit einer dünnen, neuen Knochenschicht direkt an der Spanunterseite an (Abb. 1 S.49). Zwischen den Knochenbälkchen liegen mehrere prallgefüllte Gefäße und vereinzelt Mastzellen. Die neuen Knochenspannen werden von aktiven Osteoblastensäumen ausgekleidet. Im Bindegewebe des Bruchspalts ist eine Knochenneubildung mit verwaschenen Grenzen sichtbar. Diese Neubildung zeigt nicht die schönen Osteoblastensäume wie die Knochenbälkchen an der markseitigen Fläche des Spans. Große, basophile Zellen mit einem hellen Saum sind in diesen Knochen eingeschlossen. Es dürfte sich hier um des möglichen Knochen handeln. Die Bruchspalten sind noch nicht geschlossen. Das Transplantat ist von jugendlichem, proliferierendem Bindegewebe umgeben. An der markseitigen Transplantatfläche hat die osteoclastäre Resorption und das Eindringen von gefäßhaltigem Bindegewebe bereits begonnen (Abb. 2, S.49). Die Osteoclastentätigkeit wickelt sich an der Außenfläche des Transplantats und den oberflächlich gelegenen Havers'schen Kanälen ab. Die Mehrzahl der Osteocytenhöhlen des Spans ist leer, jedoch sind in der Umgebung Havers'scher Kanäle unverändert erscheinende Osteocyten sichtbar. An

der Außenseite in Resorption befindliches Hämatom mit nekrotischen Muskelfasern. Auf der gegenüberliegenden Seite des Transplantats und auf der gleichen Seite ist eine lebhafte, periostale Reaktion, jedoch noch keine Knochenneubildung zu sehen.

Präparat (A 38): Fibroblastenreiches Bindegewebe sprießt in den Bruchspalt ein. In helle, homogene Formationen sind längliche Zellen eingelagert. Hier handelt es sich um desmogene Knochenneubildung, die in Abb. 3 S. 50 besonders deutlich zu sehen ist. Diese Knochenart ist hauptsächlich im Bruchspalt zu finden.

Präparat (A 40):

Auffallend ist hier im Vergleich zu den bisher beschriebenen Präparaten die starke Knochenneubildung im Markraum an der Unterseite und an den Bruchenden (Abb. 4 S. 50). Die in einer schmetterlingsähnlichen Form angeordneten Knochenbälkchen haben eine Brücke zwischen beiden Bruchenden hergestellt. Die starke Knochenneubildung ist möglicherweise auf die Strontiumwirkung zurückzuführen. Zwischen den neuen Bälkchen sind gefüllte Gefäße und Osteoblastensäume zu sehen. Transplantatseitig sowie gegenüberliegend hat periostale Knochenbildung eingesetzt.

b. Tiefgekühlte Homoioplastik

Präparat (OR):

An den markseitigen Bruchenden des Femurs hat Knochenbildung begonnen. In den Bruchspalten, sowie unter dem Span entwickelt sich desmogener Knochen (Abb. 5, S. 51). Transplantatseitig hat sich in einigem Abstand vom Transplantationsort subperiostaler Knochen gebildet (Abb. 6, S. 51). Der Span ist von lebhaft proliferierendem, fibroblastenreichem Bindegewebe umgeben, welches stark mit Rundzellen durchsetzt ist. Transplantatnah und in den Bruchspalten wird das Fasermaterial homogen, an manchen Stellen "Chondroid" ohne dessen färberischen Eigenschaften. Im Bereich der wirtsknochennahen Knochenspannen und den transplantatseitig anliegenden Zellagen finden sich ausgedehnte Zellnekrosen. Die neue Formation in der Nähe des Spans besitzt nur mehr schattenhafte Osteoblastensäume. Die an manchen Stellen stattgehabte, büschelförmige, osteoclastäre Resorption des Transplantats weist vorwiegend nekrotische Zellen auf. Auch die an der Außenseite des Spans liegenden Osteoclasten sind nur noch als Schatten auszumachen und haben ihre Basophilie verloren. Im Zentrum des Transplantats sind noch vereinzelte Havers'sche Systeme mit normalen Zellen gefüllt. Transplantatnah ist kein gefülltes Gefäß sichtbar, weiter entfernt vom Span sind die Ge-

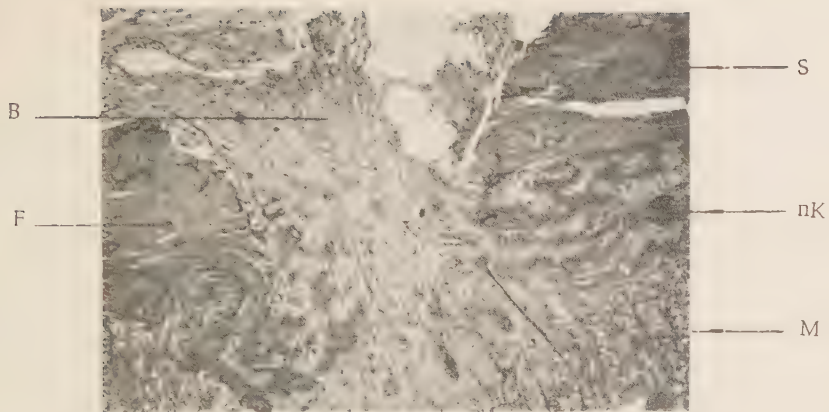


Abb. 1 (Präp. A 36, Vergr. 50 mal): 8 Tage nach der Transplantation. - Linker Bruchspalt mit neuen Knochenbälkchen an der Spanunterseite (rechts) und an der Markseite des Femur. F Femur; S Span; nK neuer Knochen; M Mark; B Bruchspalt mit Bindegewebe

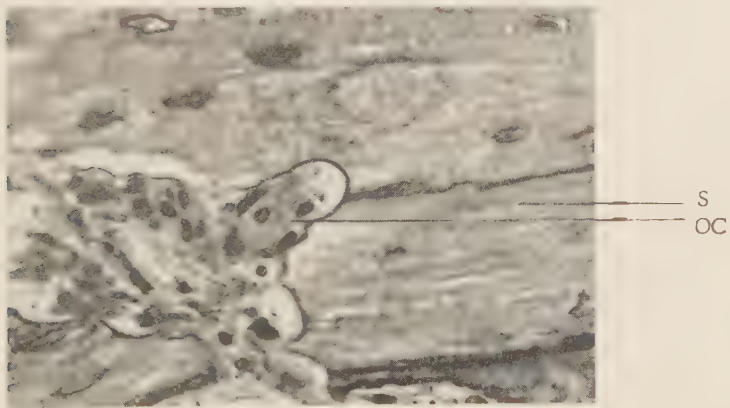


Abb. 2 (Präp. A 36, Vergr. 500 mal): 8 Tage nach der Überpflanzung. - Resorptionsbucht an der Spanunterseite mit aktiven Osteoclasten. S Span; Oc Osteoclast

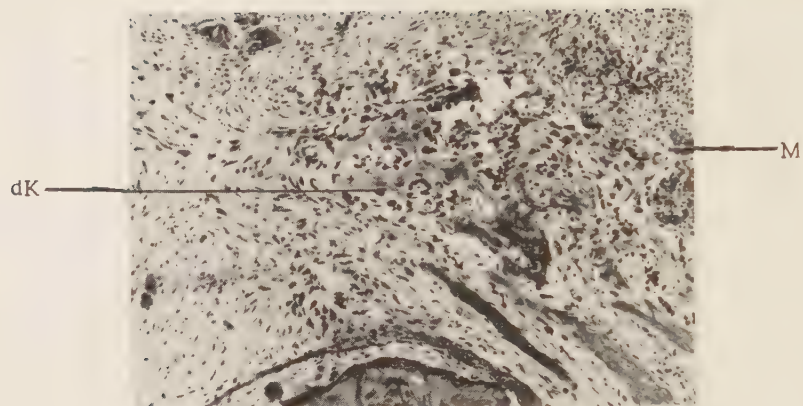


Abb. 3 (Präp. A 38, Vergr. 125 mal): 8 Tage nach der Transplantation. - Desmogene Knochenbildung im rechten Bruchspalt. dK desmogener Knochen; M Mark

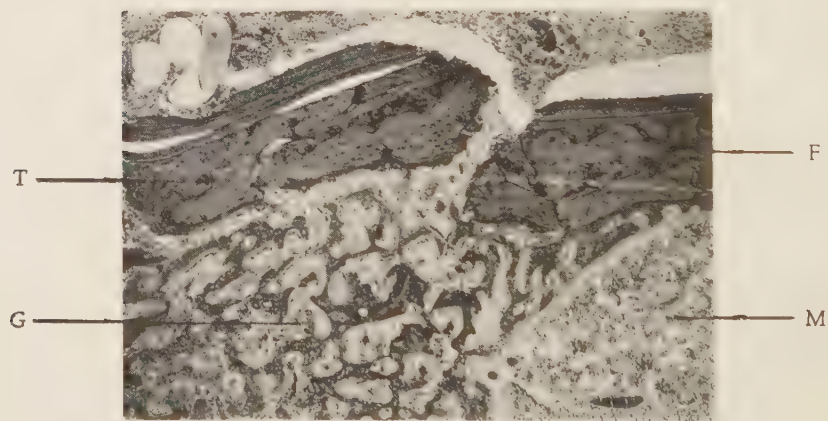


Abb. 4 (Präp. A 40, Vergr. 50 mal): 8 Tage nach der Transplantation. - Starke Knochenneubildung unter dem Transplantat und am markseitigen Bruchende des Femur. Gefäße gut sichtbar. T Transplantat; F Femurschaft; M Markraum; G Gefäße

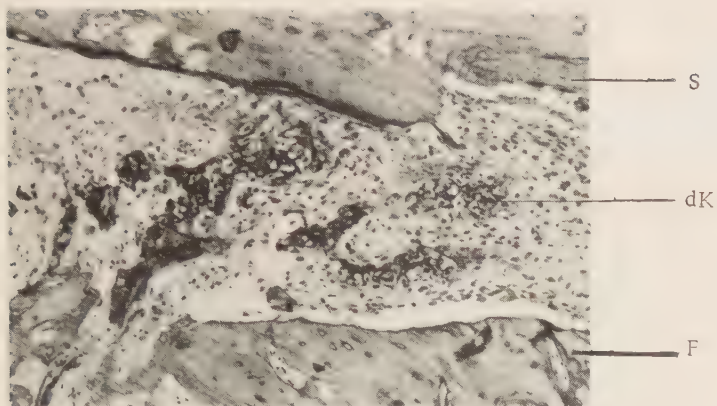


Abb. 5 (Präp. OR, Vergr. 125 mal): 8 Tage nach der Transplantation. - Desmogene Knochenbildung im rechten Bruchspalt. dK desmogener Knochen
S Span; F Femur

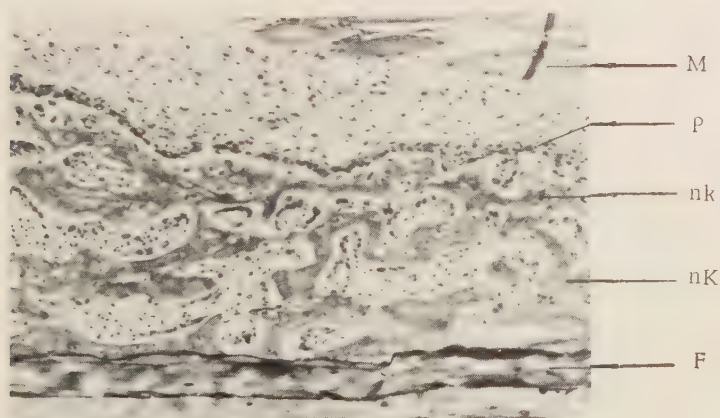


Abb. 6 (Präp. OR, Vergr. 125 mal): 8 Tage nach der Transplantation. -Subperiostale Knochenneubildung am Femurschaft. P Periost; nk neuer, periostaler Knochen; F Femur; M Muskulatur

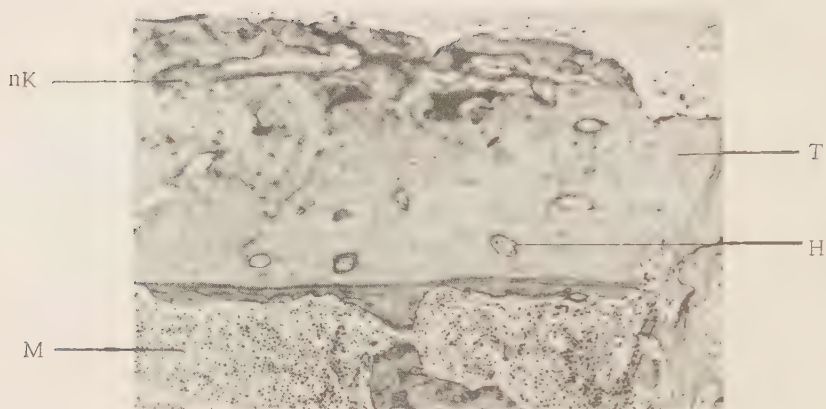


Abb. 7 (Präp. A 35, Vergr. 125 mal): Autoplastik, 16 Tage nach der Transplantation. - Erweiterte Havers'sche Kanäle im Transplantat mit Zellen und neuen Knochen. T Transplantat; H Havers'sche Kanäle; nK neuer Knochen; M Markraum

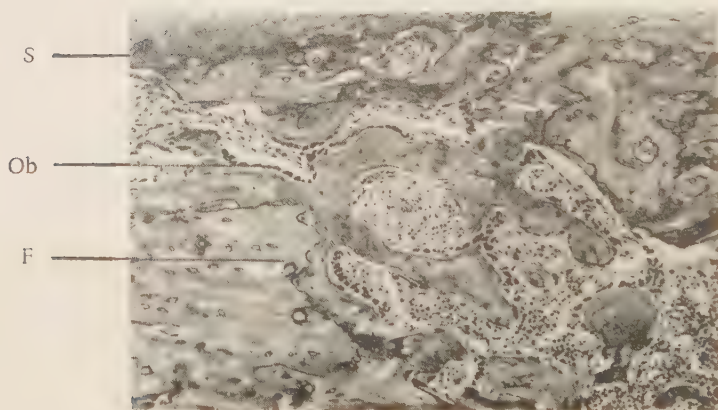


Abb. 8 (Präp. HO 38, Vergr. 125 mal): Homoplastik, 16 Tage nach der Verpflanzung. - Neuer Knochen mit Osteoblastensäumen schließt eng am Femur und Span an. nK neuer Knochen; Ob Osteoblasten; F Femur; S Span

fäßwände aufgequollen und lassen keine Endothelzellen erkennen. Die im nekrotischen Gebiet liegenden Zellen bestehen aus Rundzellen und Fibrocyten. Der Zelluntergang ist am ausgeprägtesten unterhalb des Transplantats und im Bereich des neugebildeten Wirtsknochens und nimmt nach außen hin ab, so daß mit zunehmender Entfernung vom Transplantat gegen die Muskulatur der Zelluntergang nachläßt.

Präparat (HO 42):

Spärliche Knochenbildung. An der Transplantatunterseite und in den Bruchspalten hat sich kein neuer Knochen gebildet. Der Span ist von fibroblastenhaltigem Bindegewebe eingescheldet, in dem einige desmoide Knochenstrukturen liegen. Die Rundzelleninfiltrate im Bindegewebe, in der Muskulatur und der Zelluntergang in Transplantatnähe deuten auf eine immunologische Reaktion hin.

Präparat (OS):

Hier fehlt das Transplantat. Aus dem eröffneten Markraum sprießt pilzförmig neues Knochengewebe. An der Spitze dieses Pilzes haben sich massenhaft stark basophil gefärbte Zellen angesammelt. Transplantatseitig sowie auf der gegenüberliegenden Femurseite periostale Knochenbälkchen.

c. Heteroplastische Spanverpflanzung

Präparat (HE 47):

Durch lebhafte Knochenbildung im Markraum entstand eine Brücke mit den markseitigen Bruchenden. Die neuen Knochenbälkchen schließen teilweise an die Transplantatunterseite an und sind von aktiven Osteoblasten umsäumt. Zwischen den Knochenstangen liegen Spanteile, die resorbiert werden. Das Transplantat ist von älterem und jugendlichem, fibroblastenreichem Bindegewebe umgeben mit vereinzelt Rundzelleninfiltraten. An der Außenseite des Implantats und an den Bruchrändern sind einige Osteoclasten am Werk. Im Bereich der markseitigen Knochenbälkchen und zwischen den Muskelfasern sind prallgefüllte, normalaussehende Gefäße gelegen.

Präparat (HE 49):

Hier hat der neue Knochen ebenfalls wie im vorherigen Präparat eine Brücke in Markhöhe geschlagen, während die Bruchspalten noch nicht geschlossen sind. Im linken Bruchspalt liegen einige desmogene Formationen zwischen dem Bindegewebe. Die neuen Bälkchen zeigen noch keinen Anschluß

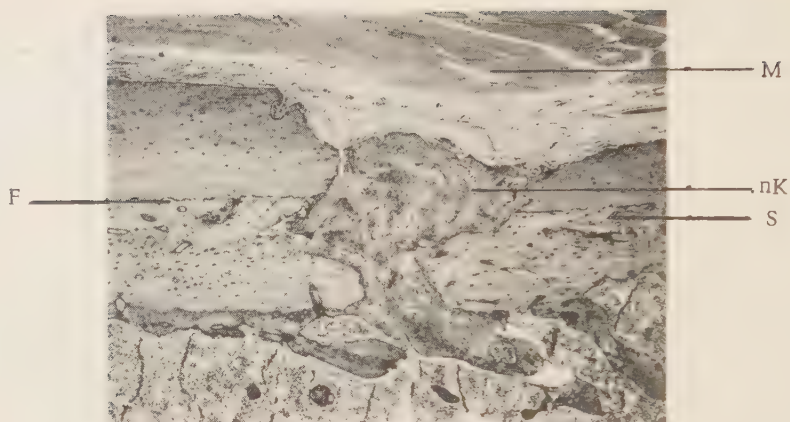


Abb. 9 (Präp. AZ, Vergr. 50mal): Autoplastik, 3 Wochen post transpl. - Verlagerung der Knochenneubildung in den Bruchspalt. S Span; F Femur; nK neuer Knochen; M Muskulatur

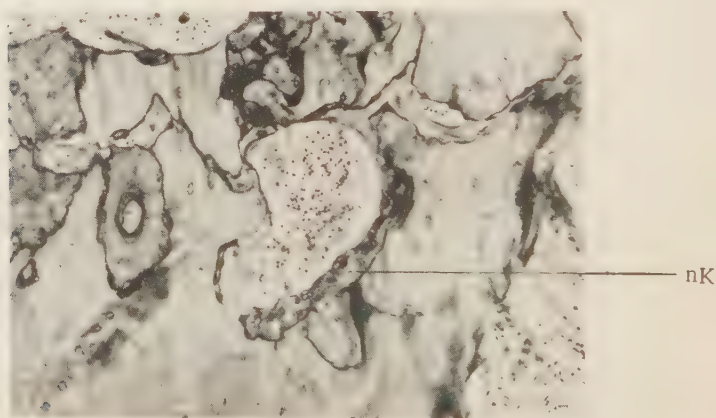


Abb. 10 (Präp. HE 33, Vergr. 125 mal): Heteroplastik, 3 Wochen nach der Verpflanzung. - Ablagerung neuen Knochens in einem erweitertem Kanal im Innern des Spans. nK neuer Knochen



Abb. 11 (Präp. HO 32, Vergr. 50 mal): Homoioplastik, 6 Wochen nach der Transplantation. - Neuer Knochen im linken Bruchspalt und unter dem Span. F Femur; S Span; nK neuer Knochen; M Muskulatur

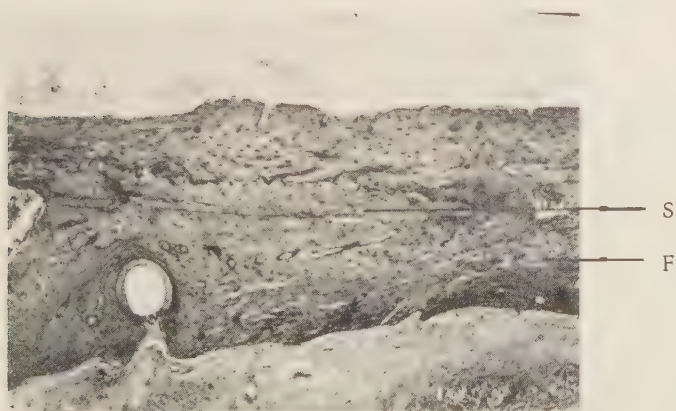


Abb. 12 (Präp. AC, Vergr. 50mal): Autoplastik, 6 Monate nach der Transplantation. - Der Rest des Spans ist nur noch an der gezackten Linie zu erkennen. S Span; F Femur

an die markseitige Fläche des Spans. Bruchspaltnah und in weiterem Abstand hat sich periostaler Knochen abgelagert.

2) 16 Tage nach der Transplantation:

a. Frische Autoplastik

Präparat (A 35):

Die markseitige Osteogenese ist zum Stillstand gekommen. Osteoblastensäume fehlen. Die neuen Knochenbälkchen machen einen ruhenden Eindruck. Die Markhöhle reicht jetzt bis an die Transplantatunterseite heran. Die Havers'schen Kanäle des Spans sind erweitert, mit Zellen gefüllt und in einigen hat sich bereits neues Knochengewebe abgelagert (Abb. 7, S. 52). Die Gefäße in der Nähe des Spans sind gut gefüllt und unverändert. Sehr kräftige subperiostale Knochenbildung.

b. Tiefgekühlte Homoioplastik

Präparat (OG):

Neue Trabekel überbrücken auf Markniveau den Defekt, haben aber noch keinen Anschluß an das Transplantat gewonnen. Die Bälkchen in Umgebung des Spans weisen blasse, basophile Färbung auf, und in den vielfach leeren Lakunen sind keine ordentlich gefüllten Gefäße sichtbar. Auffallend sind die vielen Mastzellen im Markraum.

Präparat (HO 38):

Die ursprüngliche Knochenbildung ist aus den restlichen Knochenspannen, die im Markraum unter dem Span liegen, zu ersehen. Der etwas über das Transplantatbett hinausragende Span hat durch osteoblastenreiche, neue Knochenbälkchen im Bruchspalt eine Verbindung mit den Bruchenden des Femur erlangt (Abb. 8, S. 52). Die Havers'schen Systeme des Transplantats sind teilweise mit Zellen angefüllt; die Osteocytenhöhlen sind leer.

Präparat (HO 40):

Viele neue Knochenspannen haben eine Brücke von einem Bruchende zum anderen geschlagen, in Markraumniveau. Der neue Knochen hat breiten Anschluß an die markseitige Fläche des Transplantats bekommen. In den Maschenräumen kann man neben vielen Mastzellen immer noch blasse, untergegangene Osteoblasten erkennen, jedoch finden sich jetzt schon an vielen Stellen normal aussehende Osteoblasten. Nur in den marknahen, neugebildeten Knochenabschnitten finden sich größere, normale Gefäße, während sie sich in der Nähe des Spans nicht mit Sicherheit ausmachen lassen. Die Bruchspalten sind noch nicht geschlossen; in diese wächst von außen reifes

Bindegewebe ein. Keine desmogene Knochenbildung. Die Havers'schen Kanäle des Transplantats sind größtenteils leer oder mit Zelldetritus angefüllt. Transplantatseitig ist eine kräftige, periostale Knochenbildung nachweisbar.

c. Heteroplastische Transplantation

Präparat (HE 44):

In Markraumnähe noch vereinzelt Knochenneubildung, während die übrigen Bälkchen einen abgeschlossenen Eindruck machen und an einigen Stellen sogar durch Osteoclasten abgebaut werden. Das Transplantat hat nur spärlichen Anschluß an den neuen Knochen erhalten - vorwiegend über vereinzelte, desmogene Formationen. Das Implantat ist von einer narbigen Bindegewebsschicht umgeben. Das Mark ist noch nicht in den Bereich der neugebildeten Spongiosa vorgedrungen. Spärliche, periostale Knochenbildung transplantatseitig, kräftige auf der gegenüberliegenden Seite.

Präparat (HE 52):

zeigt etwa den gleichen Befund wie das vorhergehende. Auffallend ist nur die starke Vaskularisation im Markraum.

3) 3 Wochen nach der Transplantation

a. Frische Autoplastik

Präparat (AZ):

Die gesamte Knochenbildung hat sich jetzt in den Bruchspalt verlagert, wo unter zahlreichen aktiven Osteoblastensäumen eine lebhaftere Knochenbildung stattfindet. Der zuerst entstandene markseitige Knochen unter dem Transplantat ist zum größten Teil resorbiert worden und nur noch an einigen Knochenspangen zu erkennen. Der Markraum ist jetzt bis an den Span vorgedrungen. Nur spurenweise desmogene Knochenbildung. Der neue Knochen im Bruchspalt schließt sowohl am Span als auch am Bruchende des Femur eng an (Abb. 9, S. 54). An den Kanten des Transplantats teilweise osteoclastärer Abbau. Bindegewebe sprießt in den Span ein, wobei die Havers'schen Kanäle gegenüber den vorherigen Stadien erweitert sind und Osteoclasten wie auch neugebildeten Knochen enthalten. Die periostale Knochenbildung ist geringer geworden; während sie sich in vorhergehenden Schnitten senkrecht zur Knochenoberfläche entwickelte, bestehen jetzt solide Spangen, in deren Lakunen sich teilweise Markgewebe befindet. Die periostale Reaktion gegenüber dem Span ist ebenfalls zum Stillstand gekommen, wobei hier durch vereinzelt Osteoclastentätigkeit die Auflösung

einiger Knochenspangen begonnen hat. Die anderen autoplastischen Präparate zeigen etwa den gleichen Befund.

b. Tiefgekühlte Homoioplastik

Präparat (OP):

Das Wachstum der markseitigen Knochenbälkchen ist abgeschlossen. Der linke Bruchspalt wird von einwachsendem Bindegewebe ausgefüllt, welches vereinzelte Rundzellen aufweist. In den Maschenräumen des transplantatnahen neuen Knochens sind viele Rund- und Mastzellen gelegen. Die Havers'schen Systeme sind mit Zelldetritus angefüllt. Die verhältnismäßig starke Knochenneubildung im Markraum ist wahrscheinlich auf die Strontiumwirkung zurückzuführen.

c. Heteroplastik

Präparat (HE 33):

Die neuen Knochenspangen liegen der Transplantatunterseite und dem Wirtsknochen eng an. Die Havers'schen Kanäle sind erweitert; mehrere Resorptionsbuchten deuten den osteoclastären Abbau des Spans an. Neue Knochenablagerung im Innern des Spans (Abb. 10, S. 54).

4) 6 Wochen nach der Transplantation

a. Frische Autoplastik

Präparat (AT):

Der autoplastische Span ist völlig in den Wirtsknochen eingebaut. Die überstehenden Stellen werden von außen her durch Osteoclasten resorbiert. Im Transplantat ist nur an einigen Stellen über osteoclastären Abbau Knochenneubildung feststellbar. Die Markhöhle reicht bis an die Unterseite des Spans heran; die ursprünglich aus dem Mark gebildeten Knochenbälkchen werden abgebaut.

b. Tiefgekühlte Homoioplastik

Präparat (HO 32):

Das Transplantat hat über eine große Menge neugebildeten Faserknochens im Bruchspalt Anschluß an den Wirtsknochen erhalten. Dieser neue Knochen ist nur stellenweise schwach verkalkt. Im Spaninneren sehr spärlicher osteoclastärer und osteoblastischer Umbau; keine Bindegewebsreaktion in der Umgebung. Auffallend bei diesem Präparat ist die starke Knochenneubildung im Bruchspalt und Markraum (Abb. 11, S. 55). Auch hier scheint die Stron-

tiumwirkung eine Rolle gespielt zu haben.

c. Heteroplastik

Präparat (HE 41):

Das Transplantat hat über neue Knochenspannen, die wesentlich geringer sind als bei Präp. HO 32, Anschluß an den Wirtsknochen erhalten. Auffallend ist der ausgeprägte von den Havers'schen Kanälen ausgehende Umbau. Durch periostale Knochenneubildung wird der Span in das Niveau des Wirtsknochens einbezogen.

5) 3 Monate nach der Transplantation

a. Frische Autoplastik

Präparat (A 16):

Das Transplantat ist völlig in den Wirtsknochen eingebaut, so daß die Unterscheidung nur noch an den Kittlinien möglich ist. Der Umbau über die Havers'schen Kanäle hat im Vergleich zu den Präparaten von 6 Wochen nicht wesentlich zugenommen.

b. Tiefgekühlte Homoioplastik

Präparat (HO 12):

Der Span ist ebenfalls völlig eingeheilt. Auch hier war die ursprünglich markseitige Knochenbildung massiv. Der Umbau hat in den Havers'schen Kanälen eingesetzt.

Präparat (HO 16):

Zeigt keinen wesentlichen Unterschied zum obigen Befund.

c. Heteroplastik

Die Ergebnisse in dieser Gruppe sind wegen Pseudarthrosenbildung nicht zu erfassen.

6) 4 1/2 Monate nach der Transplantation

a. Frische Autoplastik

Präparat (AL):

Das Transplantat ist nunmehr kaum vom Wirtsknochen zu unterscheiden. Gegenüber 3 Monaten hat der innere Umbau zugenommen.

Ein Befund über die Homoi- und Heteroplastik kann in dieser Gruppe wegen

Pseudarthrosenbildung nicht erhoben werden.

7) 6 Monate nach der Transplantation

a. Frische Autoplastik

Präparat (AC):

Das Transplantat ist völlig in den Femur eingebaut und nur noch teilweise an einer gezackten Linie erkennbar (Abb. 12. S. 55). Den gleichen Befund zeigt Präparat (AR).

b. Homoioplastik

Präparat (OQu):

Gegenüber dem dreimonatigen Span weiterer Umbau von innen und außen. Auch hier ist die massive ursprüngliche Knochenbildung erkennbar.

c. Heteroplastik

Präparat (ES):

Der Span ist völlig eingebaut. Die Havers'schen Kanäle im Inneren des Spans sind infolge resorptiver Vorgänge wesentlich erweitert und zeigen neue Knochenablagerungen. An der Außenfläche des Spans werden osteoclastäre Resorptionshöhlen von Osteoblastensäumen gedeckt.

Histologische Befunde nach zweizeitiger Transplantation

auto-, homoio- und heteroplastischer Späne

In diesen Versuchen sollte nachgewiesen werden, ob durch eine 14 Tage vor der 2. Transplantation stattgefundene erste Verpflanzung des gleichen Spanmaterials eine Sensibilisierung des Wirts eingetreten ist. Hat der Wirt infolge der Sensibilisierung durch die erste Transplantation Antikörper gebildet, so mußte durch eine zweite Berührung mit derselben Spanart eine verstärkte Antigen - Antikörperreaktion stattfinden, die sich am Transplantationsort in Form eines entzündlich-allergischen Geschehens manifestiert. Die immunologische Reaktion dürfte nach der zweiten Transplantation eines homoioplastischen Spans in verstärktem Ausmaße auftreten. Zur Kontrolle führten wir auto- und heteroplastische (Kieler Span)Transplantationen durch.

a. Frische Autoplastik

Die histologischen Befunde, 14 Tage nach der zweiten Transplantation beurteilt,

lassen in keinem der Präparate eine verstärkte, entzündliche Reaktion erkennen. Die Knochenbälkchen, welche nach der ersten Verpflanzung gebildet wurden, machen einen abgeschlossenen Eindruck, während den am 2. Transplantationsort entstandenen Knochenspanen noch teilweise Osteoblastensäume aufgelagert sind.

b. Heteroplastik

Präparat HE 3 - Al r (1. Transplantation, 4 Wochen alt):

Die neuen Knochenbälkchen besitzen keine Osteoblastentapeten mehr; die Zellen in den Lakunen sind schwach basophil gefärbt. In der Umgebung hat eine mittelstarke Bindegewebsreaktion stattgefunden.

Präparat HE 3 - Al l (2. Transplantation, 14 Tage alt):

Die Rundzellenansammlung und die endothellosen Gefäße zwischen den neuen Knochenspanen, wie auch der Zelltod in diesem Bereich, lassen eine allergische Reaktion vermuten. Im Vergleich zur 1. Transplantation ist eine stärkere Bindegewebsreaktion in der Muskulatur zu sehen.

Präparat HE 4 Al l (1. Transpl., 4 Wochen alt):

Die neuen Knochenbälkchen unter dem Span sind zum größten Teil resorbiert worden. Der neue Knochen hat sich in den Bruchspalt verlagert.

Präparat HE 4 - Al r (2. Transpl., 14 Tage alt):

Auf der gegenüberliegenden Seite des Spans ist in der Muskulatur eine Reaktion abgelaufen. Zwischen den Knochenbälkchen liegen Mast- und Rundzellen.

c. Homoioplastik

Präparat HO 3 - Al r (1. Transpl., 4 Wochen alt):

Die Osteoblastensäume an den neuen Knochenspanen sind nur noch schattenhaft zu erkennen. In der Umgebung des Spans breitet sich ein zellreiches Bindegewebe aus.

Präparat HO 3 - Al l (2. Transpl., 14 Tage alt):

Im Vergleich zur 4 Wochen alten Transplantation ist mehr neuer Knochen entstanden, der den Bruchspalt schließt. Die Maschenräume zwischen den Bälkchen beherbergen viele Rundzellen, einige Mastzellen und sehr viele Gefäße. Diese Gefäße zeigen jedoch kein schönes Endothel. Die Osteoblasten sind zum größten Teil abgestorben. Die neuen Knochenbälkchen scheinen ebenfalls dem Untergang nahe. In die Bruchspalten dringt ein basophiles Gewebe ein.

ZUSAMMENFASSUNG

Die histologischen Befunde nach frischer Autoplastik zeigten keine allergische Reaktion nach der ersten oder zweiten Transplantation. Der autoplastische Span wirkt also nicht als Antigen.

Nach der ersten homoioplastischen Transplantation ist zwar eine allergische Reaktion abgelaufen, die aber nach 4 Wochen weitgehend abgeklungen ist. Am zweiten Transplantationsort hat eine verstärkte Einwanderung von Rund- und Mastzellen zwischen die neuen Knochenspannen begonnen. Auffallend sind die großen Blutextravasate im Markraum. Die Rundzellenansammlungen, die blaß gefärbten Osteoblasten, die zahlreichen, neuen Gefäßsprossen und deren gleichzeitiger Untergang, wie auch das zellreiche Bindegewebe in der Umgebung des 2. Transplantationsortes lassen eine Sensibilisierung des Wirts durch die erste Transplantation vermuten. Die nach der ersten Verpflanzung gebildeten Antikörper haben zu einer verstärkten immunologischen Reaktion am 2. Transplantationsort geführt (BURWELL).

DISKUSSION

I. Der Einheilungsverlauf

a) Frische Autoplastik

Der frische, autoplastische Span heilt ohne auffällige Reaktion des Wirtsgewebes ein. Nach kurzer Zeit ist gefäßreiches Bindegewebe in die Havers'schen Kanäle eingewachsen, und der Umbau des Spans hat sowohl an der Oberfläche als auch im Innern begonnen. Schon 8 Tage nach der Verpflanzung haben sich im Markraum an der Unterseite des Transplantats und an den markseitigen Bruchenden neue Knochenspannen gebildet. In beide Bruchspalten sprießt von außen Bindegewebe ein; darin lagert sich desmogener Knochen ab. Drei Wochen nach der Transplantation ist ein großer Teil der unter dem Span liegenden, neuen Trabekel resorbiert worden und die Knochenneubildung hat sich in den Bruchspalt verlagert. Das Transplantat gewinnt über die neuen Knochenspannen Anschluß an die Bruchenden des Femur. Bereits nach 6 Wochen ist es fest in den Wirtsknochen eingebaut. Unter Zunahme der resorptiven Abbauvorgänge und des gleichzeitig stattfindenden inneren Umbaus ist der frische, autoplastische Span nach 3 und 4 1/2 Monaten völlig eingeeilt. Sechs Monate post transplantationem sind die Reste des Spans nur noch durch ihre leeren Osteocytenhöhlen und an einer gezackten Linie vom umgebenden Knochen zu unterscheiden. Von der einst-

mals vorhandenen Bruchstelle ist nichts mehr zu sehen.

b) Heteroplastik

Der heteroplastische "Kieler Span" zeigt in seinem Einheilungsverlauf etwa das gleiche histologische Bild wie die frische Autoplastik. Die aufgelockerte Struktur dieser Spanart ermöglicht dem Lagerbindegewebe ein schnelles Einwachsen und fördert den inneren Umbau. Die Pseudarthrosenbildung bei den 3 und 4 1/2 Monate nach der Transplantation getöteten Versuchstieren ist möglicherweise als ein Ergebnis des zu schnellen Abbaues aufzufassen. Durch den zu raschen Resorptionsvorgang konnte der Span seine "stützende Funktion" nicht lange genug erfüllen und so kam es zu Ermüdungsbrüchen mit anschließender Pseudarthrosenbildung.

c) Tiefgekühlte Homoioplastik

Die Einheilung des tiefgekühlten, homoioplastischen Spans ist anfangs durch den Ablauf einer allergischen Reaktion verzögert. Der früh gebildete, neue Knochen geht infolge dieser Abwehrvorgänge von seiten des Wirtsgewebes bald wieder zugrunde. Erst 6 Wochen nach der Verpflanzung - also zu einem Zeitpunkt, an dem die immunologische Reaktion schon wieder abgeebbt ist, - hat eine beträchtliche Menge jungen Faserknochens die Bruchspalten verschlossen und eine enge Verbindung zu den Bruchenden hergestellt.

II. Die biologische Wertigkeit

Der frische, autoplastische Span und der "Kieler Span" sind der tiefgekühlten Homoioplastik in den ersten Wochen nach der Transplantation hinsichtlich der Knochenneubildung und Einheilung überlegen. Durch die Ausräumung der Knochenkanäle und die Entfernung des artfremden Eiweißes mittels geeigneter Macerationsverfahren ist das Einwachsen des Lagergewebes und damit die Einheilung und der Umbau des heterologen Spans erleichtert worden (MAATZ, 1957). Der raschere, resorptive Abbau des H_2O_2 -Spans (Macerationsverfahren nach BAUERMEISTER, 1958) mindert jedoch seine Stützfunktion. Im ersatzschwachen Lager vermag der Kieler-Span das autoplastische Knochengewebe nicht zu ersetzen; im ersatzstarken knöchernen Lager ist er jedoch dem Autotransplantat gleichwertig. Nach unseren Versuchen ist die tiefgekühlte Homoioplastik trotz der anfänglichen Verzögerung durch eine starke Knochenneubildung ausgezeichnet und bereits 6 Wochen nach der Operation den beiden anderen Spanarten hinsichtlich der osteogenen Fähigkeit und der Einheilungstendenz ebenbürtig. Daraus ergibt sich, daß der tiefgekühlte, homoioplastische Span wegen des langsameren, resorptiven Abbaues dort, wo Festigkeit verlangt wird, indiziert ist, jedoch mit der Einschränkung, daß er in infekgefährdeten Regionen sicher an-

fälliger für Infektionen ist als die frische Autoplastik oder der "Kieler Span".

III. Die Funktion des Transplantates

Wie die geschichtliche Einleitung zeigt, lassen sich aus der umfassenden Literatur, die sich mit diesem Problem auseinandersetzt, trotz der verschiedensten Richtungen drei Haupttheorien aufstellen:

1. Zelluläre Eigenleistung des Spans (= Osteoblastentheorie)
2. Humorale Eigenleistung des Spans (= Induktionstheorie)
3. Fehlende Eigenleistung des Spans (= Leitschientheorie).

Die Entwicklung der Osteoblastenlehre beginnt mit den Versuchen OLLIERS, der im transplantierten Peri- und Endost jegliche Grundlage für eine Osteogenese sieht. Unlängst konnte AXHAUSEN W. die Bedeutung des Periosts für die frische Autoplastik nachweisen (s. Einleitung S. 11/12). Voraussetzung ist jedoch intaktes Periost, da wir an periostlosen Stellen trotz erhaltener Kambiumschicht keine Knochenneubildung beobachten konnten. Das Periost scheint bei der Autoplastik neben seiner osteogenetischen Fähigkeit auch noch eine gewisse Schutzfunktion auszuüben. Über die Rolle der Transplantatosteocyten bei der Osteogenese bildeten sich unterschiedliche Urteile. BARTH lehnt ein Überleben dieser Zellen ab. Wir konnten in den autoplastischen Transplantaten stets einige unveränderte Zellen finden. Nach ANDERSON und AXHAUSEN ist die erste Phase der Knochenbildung ein Produkt der Transplantatosteocyten, da sie in den Lakunen frischer auto- und homoioplastischer Späne unveränderte Osteocyten entdeckten. Wir konnten in unseren Befunden keine überlebenden Zellen in den Havers'schen Systemen erkennen, was bedeuten würde, daß nur Osteocyten oder das Peri-, bzw. Endost des Spans als osteogenetische Faktoren in Frage kommen. Bei der Homoioplastik wird wie bei der Autoplastik in einer ersten Phase neuer Knochen gebildet, der jedoch abstirbt. Erst nach einer gewissen Latenzzeit setzt die Knochenbildung wieder ein. CHALMERS, ANDERSON, HANCOX u. a. machen Immunreaktionen für den Untergang des neuen Knochens verantwortlich. Das Fehlen der ersten Phase neuen Knochens nach Allergisierung des Tieres durch eine vorangehende, homoioplastische Hauttransplantation ist nach CHALMERS auf das Absterben der Osteocyten infolge einer Immunreaktion zurückzuführen. CHALMERS argumentiert, daß somit das Ausbleiben der Osteogenese ein Beweis für die Beteiligung der Spanosteocyten an der frühen Phase der Knochenbildung sei. ANDERSON interpretiert seine Versuchsergebnisse in der gleichen Richtung. Dagegen ist jedoch folgendes einzuwenden. Bei ANDERSONs Versuchen in der vorderen Augenkammer setzt die erste Phase der Knochenneubildung an auto- und homoioplastischer Spongiosa am 8. Tag ein; also zu einem Zeitpunkt, an dem Gefäße in den Span einwachsen. Den Transplantationsort und den Zeitpunkt der

ersten Knochenbildung halten wir für wichtig, da wir bei Verpflanzung in den Knochen bereits um den 4. Tag neue Knochensäume feststellen konnten. Es besteht kein zwingender Grund, die Transplantatosteocyten als Ursache der Knochenbildung der frühen Phase anzusehen. Den Befund von CHALMERS, daß die Hyalinisierung der Gefäßwände und der Verschluß der Gefäßlumina Folgen der allergischen Reaktion sind, können wir bestätigen. Weiterhin machten wir die Beobachtung, daß nicht nur die Osteoblasten am Transplantat, sondern auch die Osteoblastensäume an den neugebildeten Knochenspangen absterben, welche sich eindeutig vom Endost oder dem wirtseigenen Gewebe ableiten. So sind wir der Ansicht, daß für das plötzliche Sistieren der Knochenneubildung eher der Gefäßuntergang als das Absterben von Transplantatosteocyten verantwortlich zu machen ist. Damit fallen aber wesentliche Argumente der Osteoblastenlehre. Weiterhin spricht unser Befund, daß sich am Transplantat erst dann neue Knochenformationen bilden, sobald es von den Knochengefäßspangen des Wirts erreicht wurde, gegen diese Theorie. Somit kann die Osteogenese nicht als alleinige Funktion des Spanosteocyten bezeichnet werden. Zuletzt stünde noch zur Diskussion, was aus den Zellen des mittransplantierten Markes oder der Havers'schen Kanäle geschieht. In unseren Befunden sieht man am 4. Tag nach der Transplantation frischer autoplastischer, gefrorener homoioplastischer und heteroplastischer Späne isolierte Gefäßknochenbälkchen aus dem Mark in Richtung Transplantat aufsteigen, ohne jedoch Anschluß an dieses zu gewinnen. Den osteogenetischen Zellen des Spans kann mit Ausnahme der frischen Autoplastik keine knochenbildende Funktion zuerkannt werden.

In letzter Zeit ist die Induktionslehre, die auf den Versuchen von SPEMANN und MANGOLD basiert, durch neue Untersuchungen wiederbelebt worden. Auf dem Gebiete der Knochentransplantation gehen die ersten Versuche über die humorale Eigenleistung des Spans auf LEVANDER zurück. Er konnte bei Kaninchen nach Injektion eines Knochenextraktes Knorpel- und Knochenbildung erhalten. Das die Induktion auslösende Agens suchte er im Span, aus dessen absterbenden Zellen ein Nekrohormon frei würde. Diese hypothetische Annahme führte zu mehr oder minder erfolgreichen Versuchen eine induzierende Substanz aus zugrundegehendem Knochengewebe zu isolieren (ANNERSTEN, LACROIX, ROTH). SCHINK konnte nur sehr selten in seinen Versuchen neuen Knochen erzeugen. In seinen Versuchen mit Collodium umhüllten Spänen, die in das omentum majus von Meerschweinchen verpflanzt wurden, deutet SCHINK jedoch die mögliche Existenz eines vom toten Span freiwerdenden Stoffes an. Auch OBERDALHOFF sieht in der Knochenneubildung einen humoralen Vorgang, der durch einen sogenannten K-Faktor bedingt sei. Gegen die Extraktionsversuche von LEVANDER und ROTH ist einzuwenden, daß Kaninchen als Versuchsobjekte dienten, deren besondere Neigung zur heterotopen

Knochenneubildung schon lange bekannt ist (v. SEEMEN, SEVERI). So gelang es HEINEN, DABBS und MASON bei Kaninchen schon auf reine Alkoholinjektionen hin eine Osteogenese anzuregen. AXHAUSEN W. überprüfte die LEVANDERSchen Versuche an Hunden und konnte in keinem Fall Knorpel oder Knochen erzeugen. Schließlich glückte es NOBUKATSU allein durch Formalininjektionen in das Auge eine Verknöcherung herbeizuführen. Hier sind vielleicht noch die Untersuchungen von MOSS erwähnenswert, der mit Knochenextrakt imprägnierte Fibrinschwämme in Leptomeninx, Milz und Schenkelmuskulatur von Ratten verpflanzte. Ältere Tiere zeigten nur in der Leptomeninx Knochenbildung, einwöchige Ratten dagegen teilweise auch in Milz und Muskulatur. Wir sind der Ansicht, daß zwischen Beschleunigung der Knochenbildung und Induktion ein strenger Unterschied gemacht werden soll. So ist es in keinem der folgenden Beispiele angebracht von Induktion zu sprechen, wenn auch unter günstigen Bedingungen Knochen- oder Kalkkonkremente entstehen können. Die typischen Zeichen der Vitamin D-Intoxikation sind Zellnekrosen mit Ablagerung von Mucopolysacchariden und anschließender Verkalkung. Neutrale Mucopolysaccharide in den Nierentubuli, die nach einer pH-Verschiebung in den sauren Bereich verkalken, sind ein Charakteristikum bei experimentellem Hyperparathyreoidismus. Als drittes Beispiel wäre die Uromucoprotein produzierende Blasenschleimhaut anzuführen, welche nach Implantation in die Bauchmuskulatur osteogenetisch wirksam ist. Trotz mancher eindrucksvoller Befunde sind mit der Induktionstheorie in deren gegenwärtigem Stand keineswegs alle Probleme der Osteogenese zu erklären.

HEY GROWES, PAGE und PERKINS sprechen dem Span lediglich eine Stützfunktion zu; er diene dem jungen Knochen als Leitschiene. Auch die gute Knochenbildung nach Implantation von Kieler Spongiosaspänen in leistungstarkes Lager ist weder mit der Osteoblasten- noch Induktionslehre eindeutig zu beantworten, da diesem Spanmaterial die Eiweißkörper entzogen wurden und es sich nur mehr um anorganische Substanz handelt.

BAUERMEISTER u. a. betrachten den chemischen Reiz des anorganischen Baustoffes als induzierenden Faktor. Die Spongiosa stelle infolge ihrer aufgelockerten Struktur und ihrer großen Oberfläche vermehrt Calciumionen zur Verfügung und sei für das einwachsende Gefäßbindegewebe eine stützende Schiene.

Jedoch die Leitschientheorie allein kann nicht vollkommen befriedigen, da sie zu weit gefaßt ist. Jeder Heilungsprozeß erfordert zur zellulären Organisation ein Klettergerüst, wie etwa das Hämatom das faserige Fibrin. Es muß also noch ein weiterer Faktor hinzukommen, der die Osteogenese entscheidend beeinflusst.

Versuche mit PVC-Schwämmen, verschiedenporigen Folien und Filzen führten häufig zu mäßigen Calciumeinlagerungen. Auffällig ist, daß Schwämme im Weichteillager aufgelockert wurden, während die mit MOSSschem Extrakt im-

prägnierten Fibrinschwämme nach Verpflanzung in die Schädelkapsel geringe Zerstörung und kräftige Knochenbildung zeigten. Weiterhin ist erwähnenswert, daß die Mehrzahl implantierter Materialien, die in der vorderen Augenkammer Knochen bilden, im Weichteillager schnell resorbiert werden. Hierher gehören auch die Befunde von SELYE, der bei Verpflanzung von verschiedenen dimensionierten Röhren in die Muskulatur nur bei einem ganz bestimmten Durchmesser in deren Lumen Knochenbildung beobachtete. Bei einem Vergleich der verschiedenen Transplantationsbefunde fällt die Tatsache auf, daß Knochenneubildung stets an Orten mechanischer Ruhe, wie Schädelkapsel, Augenkammer, SELYE'sche Röhre, Milz und Niere stattfand. Die gleiche Interpretation läßt sich auch auf ANDERSON's Ergebnisse anwenden. Er verglich die osteogenetische Potenz verschieden großer Späne nach Implantation in die vordere Augenkammer. Bei Knochensplintern um 0,3 - 0,7 mm ergab sich nicht einmal nach Autoplastik Knochenbildung, bei Stücken von etwa 2,8 mm war sie jedoch ausreichend vorhanden. Die kleinen Partikel wirken trotz der verhältnismäßig großen mechanischen Ruhe der Augenkammer als Fremdkörper und werden abgebaut.

ZUSAMMENFASSUNG

Es war Aufgabe der vorliegenden Untersuchung, den Einheilungsverlauf verschiedener Transplantattypen mittels einer standardisierten Methode an Ratten zu verfolgen. Zur Verwendung kamen autoplastische, bei 20 Grad eingefrorene homoioplastische und heteroplastische Knochen in Form des Kieler Spans. Unter Berücksichtigung der neueren Kenntnisse für Mikrostruktur des Knochens und der biologischen Vorgänge bei der Frakturheilung kommen wir auf Grund unserer Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen:

1. Das Transplantatbett ist der Ausgangspunkt der Einheilungsvorgänge. Sie unterscheiden sich grundsätzlich nicht von der Frakturheilung.
2. Dem Transplantat kommt eine rein passive Funktion zu. Es bietet der vom Wirt ausgehenden angiogenen Knochenneubildung einen Ort mechanischer Ruhe und riegt einen Defekt gegen das Einwuchern des blockierenden Bindegewebes ab.
3. Der Einheilungsvorgang der einzelnen Transplantattypen ist im Prinzip gleich. Der Ablauf ist jedoch unterschiedlich.
 - a) Die autoplastischen Späne werden am schnellsten eingebaut. Wegen des parallel ablaufenden osteoclastischen Abbaus sind nach 6 Wochen nur mehr kleine Reste nachweisbar.
 - b) Bei den homoioplastischen Spänen kommt es am 8. Tag zu einer vaskulären allergisch-hyperergischen Reaktion vom Arthustyp auf Grund zellulärer Antikörper. Das wirtseigene Gewebe in der Transplantatumgebung stirbt ab. Nach 3 Wochen läuft die Einheilung ungestört weiter. Der homoioplastische Span wird im Gegensatz zum autoplastischen gering verzögert eingebaut und langsamer resorbiert.
 - c) Die Heteroplastik löst keine allergische Reaktion aus. Der Einbau verläuft gegenüber der Autoplastik verzögert und entspricht der Homoioplastik.
4. Eine Einstufung nach der biologischen Wertigkeit ist insofern nicht besonders sinnvoll, da jedes Transplantat seine eigene Indikation hat.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ALGIRE, G.H.: J.Nat. Cancer Inst. 15:493, 1954.
- ALLGÖWER, L.: Plastic a. Reconstructive Surg. 9:1, 1952.
- AMPRINO, R. u. A. ENGSTRÖM: Acta Anat. 15:1, 1952.
- ANDERSON, K.J.: Bone Jt. Surg. 43-A:980, 1961.
- ANDERSON, K.J., J.A.DINGWALL: Transplant. Bull. 7:399, 1960.
- ANNERSTEN, S.: Acta chir. Scand. 84:Suppl. 60, 1940.
- AREY, L.B.: Am.J.Anat. 26:315, 1919.
- ARNOLD, J.S.a. S.S.WEBSTER: Am.J.Anat. 101:367, 1957.
- ARTHUS, M.: C.r.Soc.Biol. 55:817, 1903.
- ASBOE-HANSEN, G.: zit. bei SYLVEN in BOURNE, Kap. III, S.53, 1956.
- ASCENZI, A.: zit. bei NEUMAN, W.F. a. M.W.NEUMAN, Chicago, 1958.
- AXHAUSEN, G.: Arch.f.klin.Chir. 88:2, 1909
Verh.dtsch.Ges.Chir. 44:192, 1920.
- AXHAUSEN, W.: Langenb.Arch. 266:381, 1950
Zentralbl.f.Chir. 77:435, 1952
Beih.z.Monschr. f. Unfallh., Heft 72, 1962.
- BÄTZNER, W.: Verh.dtsch.Ges.Chir.44:66, 1920
Langenb.Arch.klin.Chir. 118:504, 1921.
- BARNICOT, N.A.: Am.J.Anat. 68:497, 1941
Am.J.Anat. 82:233, 1948
- BARTH, A.: Langenb.Arch.klin.Chir. 46:409, 1893
Beitr.z.Pathol.Anat. 17:65, 1895.
- BASCHKIRZEW, N.J. u. N.N.PETROW: Dtsch. Zs.f.Chir. 113:490, 1912.
- BAUERMEISTER, A.: Experimentelle Grundlagen für den Aufbau einer neuen Knochenbank. In: Beih. z. Monschr. f. Unfallh., Heft 58, 1958.

- BEAR, R. S.: Advances in Protein Chem. 7:69, 1952.
- BENSLEY, S. H.: Anat. Record 60:93, 1934.
- BEVELANDER, G., Anat. Record 108:1, 1950
P. L. JOHNSON: Anat. Record 109:393, 1951.
- BIER, A.: Langenb. Arch. klin. Chir. 127:1, 1923.
- BILLINGHAM, R. E., Nature 178:514, 1956.
L. BRENT, P. B. MEDAWAR:
- BOURNE, G. H.: J. Physiol. (London) 102:319, 1943
"The Biochemistry and Physiology of Bone." New
York, Academic Press, 1956.
- BRACHET, J.: Embryologie Chimique. Masson, Paris 1945.
- BREINL, H. u. M. HAURO- Hoppe-Seylers Zschr. 245:23, 1937.
WITZ:
- BRENT, L.: Prog. in Allergy, 5:271, 1958.
- BUCK, R. C.: J. Pathol. Bacteriol. 66:1, 1953.
- BÜRKLE DE LA CAMP, H.: Langenb. Arch. klin. Chir. 267:163, 1953
Med. Welt 3:139, 1960.
- BURWELL, R. G.: J. Bone Jt. Surg. 43-B:814, 1961
J. Bone Jt. Surg. 43-B:820, 1961
J. Bone Jt. Surg. 44-B:131, 1962.
- CAGLIOTI, V. ASCENZI Experientia 12:305, 1956.
u. A. SANTORO:
- CAMERON, D. A., R. A. J. Bone Jt. Surg. 40-A:414, 1958.
ROBINSON:
- CAPPELLIN, M.: Boll. soc. Ital. biol. sper. 24:1228, 1948.
- CARTIER, P. u. J. PI- Bull. Soc. Chim. Biol. 37:1159, 1955.
CARD:
- CHALMERS, J.: J. Bone Jt. Surg. 41-B:160, 1959.
- CURRAN, R. C.: J. Pathol. Bacteriol. 66:271, 1953.
- CURTISS, P. H. jun., J. Bone Jt. Surg. 41-A:482, 1959.
A. E. POWELL, C. H. HERN-
DON:

- DAY, D.T.u.G.EAVES: Bioch.et Biophys. Acta 10:203, 1953.
- DE JONG, J.u.E.VAN Beitr.path.Anat. 79:268, 1928.
- DER KEMP:
- DISTEFANO, V., Arch.Biochem. Biophys. 47:218, 1953.
- W.F.NEUMAN,
- G.ROUSER:
- DORFMAN, A.: Ann. N.Y.Acad.Sci. 56:698, 1953.
- EASTOE, J.E.: "The Organic Matrix of Bone." In: The Biochemistry and Physiol. of Bone. G.H.BOURNE (ed.), London, England, Acad.Press, Kap. IV, S.81, 1956.
- ZHRICH, W.: J.Exper.Med. 49:347, 1929.
- ELLIOT, J.R., Endocrinology 59:181, 1956.
- S.FREEMAN:
- FAGRAEUS, A.: Acta med. Scand. 130:Suppl.204,1948.
- FELL, H.B.: J.Morphol. Physiol. 40:417, 1925
- Arch.f.exper. Zellforsch. 7:390, 1928
- J.Anat. 66:157, 1932.
- FELL, H.B., R.ROBISON: Biochem.J. 24:1905, 1930
- Nature 131:62, 1933.
- FINEAN, J.B., Biochem.Biophys.Acta 11:178, 1953.
- A.ENGSTRÖM:
- FLEISCH, H., S.BISAZ: Pflügers Archiv 274:25, 1962.
- FLEISCH, H., W.F.NEU- AmJ.Physiol. 200:1296, 1961.
- MAN:
- FLEMING, W.: zit.bei PORTER, 1951.
- FLOURENS: Théorie expérimentale de la formation des os. Paris, 1847.
- GAILLARD, P.: Schweiz.med.Woch.14:217, 1957
- Devel.Biol. 1:152, 1959.
- GALLONE, L., G.RA- Arch.ed atti della Soc.Ital.di Chir. 2:329, 1952.
- DICI, G.RIQUIER:

- GEGENBAUR, C.: Jenaische Z. Naturw. 1:343, 1864
 Jenaische Z. Naturw. 3:206, 1867.
- GIBBS, J. W.: zit. bei GLIMCHER in: Calcification in Biological Systems.
 1960.
- GIBSON, T., P. B. ME- J. Anat. 77:299, 1943.
 DAWAR:
- GITLIN, D., C. A. Science 118:301, 1953.
 JANEWAY:
- GLIMCHER, M. J.: In: Calcification in Biological Systems. R. F. Sognnaes
 (ed.), Washington, D. C., Am. Assoc. for the Advance-
 ment of Science, S. 421, 1960.
- GLIMCHER, M. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 43:860, 1957.
- GOLDHABER, P.: Science 133:2065, 1961
 A. M. A. Arch. Pathol. 66:635, 1958
 In: Calcification in Biological Systems. R. F. Sognnaes
 (ed.), Am. Assoc. for the Advancement of Science,
 Washington, 1960.
- GROBSTEIN, C.: Advances in Cancer Res. 4:187, 1956.
- GROSS, J.: J. Gerontol. 5:343, 1950
 Ann. N. Y. Acad. Sci. 56:674, 1953.
- GROWES, E. W. HEY: Brit. J. Surg. 5:185, 1917.
- HAM, A. W.: J. Bone Jt. Surg. 34-A:701, 1952.
- HANCOX, N. M.: J. Physiol. 110:205, 1949.
- HANCOX, N. M., J. Biophys. Biochem. Cytol. 2:651, 1961.
 B. BOOTHROYD:
- HARRIS, T. N., J. Exper. Med. 90:169, 1949.
 S. HARRIS:
- HEINEN, J. H., J. Bone Jt. Surg. 31-A:765, 1949.
 G. H. DABBS, H. A. MA-
 SON:
- HELLER, M., F. C. Mc Am. J. Anat. 87:315, 1950.
 LEAN, W. BLOOM:

- HOLTFRETER, J., V. HAMBURGER: Analysis of Development. B. H. WILLIER, P. A. WEISS, V. HAMBURGER, Editors. W. B. SAUNDERS, Philadelphia, 1955.
- HOPKINS, T. J., J. E. Bull. Johns Hopkins Hosp. 91:1, 1952.
- HOWARD, H. EISENBERG:
- HYSLOP, D. B.: M. Sci. Thesis, University of Liverpool, 1952.
- INCLAN, A.: J. Bone Jt. Surg. 24:81, 1942.
- JACKSON, C. M.: Arch. f. Anat. u. Entwicklungsgesch. 33:70, 1904.
- JACKSON, S. F.: In: Bone as a Tissue. Edited by Kaare Rodahl, J. T. Nicholson, E. M. Brown, New York, Mc Graw-Hill Book Co., Inc., S. 165, 1960.
- JAFFE, H. L.: Arch. Surg. 20:355, 1930.
- JAKSCH, R.: Med. Wschr., Wien, 1436, 1889.
- JORDAN, H. E.: Anat. Res. 20:315, 1921.
- KEITH, A.: Menders of the Maimed. Oxford, New York, 1919.
- KIENHOLZ, M., B. KEMKES: Arch. orthop. Unfallchir. 48:623, 1956.
- KOELLIKER, A.: In: Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Engelmann, Leipzig, 1889.
- LACROIX, P.: J. Physiol. (Paris) 43:385, 1951.
- LAGUESSE, E.: Arch. biol. (Liège) 31:173, 1921.
- LAWRENCE, H. S.: Physiol. Rev. 39:811, 1959.
- LENTZ, W.: Die Grundlagen der Transplantation von fremden Knochengewebe. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1955.
- LERICHE, R., A. POLICARD: Les problèmes de la physiologie normale et pathologique de l'os. Masson, Paris, 1926.
- LEVANDER, G.: Surg. Gynec. Obstet. 67:705, 1938.
Acta chir. scand. 83:545, 1940.
- LEVANDER, G., H. WILLSTAEDT: Nature 157:587, 1946.
- LEWIS, F. T.: A Textbook of Histology. Blakiston, Philadelphia, 1913.

- LEXER, E.: Langenb. Arch. klin. Chir. 119:520, 1922
Neue Dtsch. Chir. Die freien Transplantationen. Stuttgart,
Ferdinand Enke, 1924.
Dtsch. Z. Chir. 217:1, 1929.
- LOEWE, L.: Arch. mikroskop. Anat. Entwicklungsmechanik 16:618,
1879.
- MAATZ, R.: Verh. dtsch. orthop. Ges. (Beilageheft) 87:44, 1956.
Langenb. Arch. klin. Chir. 298:239, 1961.
- Mac EWEN, W.: The Growth of Bone. Glasgow, James Maclehose & Sons,
1912.
- MARCHAND, F.: Zur Kenntnis der Knochentransplantation. Verh. Pathol.
Ges. 368, 1899.
- MARSHALL, A., H. E. Brit. J. Exper. Pathol. 31:157, 1950.
u. R. G. WHITE:
- MARTIN, B.: Langenb. Arch. klin. Chir. 144:489, 1924.
- MARTLAND, M., Biochem. J. 18:1354, 1924.
R. ROBISON:
- McMASTER, P. D., Ann. N. Y. Acad. Sci. 52:992, 1950.
R. J. PARSON:
- MEDAWAR, P. B.: In: Biological Problems of Grafting. Edited by F. Albert,
P. B. Medawar. Oxford, Blackwell Scientific Publications,
1959.
- MEDAWAR, P. B.: J. Anat. 78:176, 1944.
Proc. of the Roy. Soc. of London 149-B:145, 1958.
- MERRILL, J. P.: In: Biological Problems of Grafting. Edited by F. Albert,
P. B. Medawar. Oxford, Blackwell Scientific Publications,
1959.
- MEYER, K.: Physiol. Revs. 27:335, 1947.
- MORISON, A.: zit. bei Hancox in Bourne, Kap. VIII, 213, 1956.
- MOSS, M. L.: In: Calcification in Biological Systems, Ed. by Sognaes,
Washington, Am. Assoc. for the Advancement of Science
323, 1960.

- NAGEOTTE, J.: zit. bei C. Rouiller in: The Biochemistry and Physiology of Bone, G. H. Bourne (ed.), Kap. V 108, 1956.
- NEUBERGER, A.: Biochem. J. 49:199, 1951.
- NEUMAN, R. E.: Arch. Biochem. 24:289, 1949.
- NEUMAN, W. F.: Clin. Orthopaedics 17:124, 1960.
- NEUMAN, W. F., E. S. BOYD, T. FELDMAN: Trans. 4th Josiah Macy Conf. on Metab. Interrel. 100, 1952.
- NEUMAN, W. F., B. J. MULRYAN: J. Biol. Chem. 185:705, 1950.
- NEUMAN, W. F., M. W. NEUMAN: Chem. Rev. 53:1, 1953.
Emerging concepts of the structure and metabolic functions of bone. Sonderdruck, Rochester, New York, 1957. The chemical dynamics of bone mineral. Chicago, University Press, 1958.
- NEUMAN, W. F., T. Y. TORIBARA, B. J. MULRYAN: J. Am. Chem. Soc. 75:4239, 1953.
- NISBET, N. W., I. M. ZEISS, Brit. J. Exper. Path. 41:345, 1960.
B. F. HESLOP:
- NOBUKATSU, J.: Graefe's Arch. Ophthalmol. 125:267, 1930.
- OBERDALHOFF, H.: Chirurg 17/18:123, 1947.
Arch. klin. Chir. 260:109, 1947.
Dtsch. med. Wo. Bl. 291, 1948.
- OLLIER, L.: Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux. Paris, Masson & Cie, 1867.
- PAGE u. PERKINS: Brit. med. J. 1:608, 1922.
- PARTRIDGE, S. M.: Biochem. J. 43:387, 1948.
- PAULING, L.: J. Exper. Med. 76:211, 1942.
- PAULING, L., R. B. COREY, H. R. BRANSON: Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.) 37:205, 1951.
- PIRQUET, C.: Erg. inn. Med. 2:1, 1904.

- POMMER, G.: Virchow's Arch. Pathol. Anat. u. Physiol. 92:296, 1883.
- PORTER, K.R.: Trans. 2nd. Josiah Macy J. Conf. on Connective Tissue, S. 126, 1951.
- PRIBRAM, R.: zit. bei Neuman in: The Chemical Dynamics of Bone Mineral. Chicago, University Press, 1958.
- PRITCHARD, J.J.: J. Anat. 86:259, 1952.
The Osteoclast. In: The Biochemistry and Physiology of Bone, G. H. Bourne (ed.), New York, Academic Press, Inc., S. 179, 1956.
- RANDALL, J.T.: Nature 169:1029, 1952.
- RENAUT, J.: Compt. rend. soc. biol. 55:1620, 1903.
- RETTGERER, E.: Compt. rend. soc. biol. 80:267, 1917.
- RICH, A.R.: Bull. of the Johns Hopkins Hosp. 65:311, 1939.
- RICH, A.R.,
F.H. CRICK: Nature 176:915, 1955.
- RIESS, E.: Arch. klin. Chir. 129:750, 1924.
- ROBIN, C.H.: Compt. rend. soc. biol. 1:149, 1849.
J. Anat. 1:88, 1864.
- ROBINSON, R.A.,
M.L. WATSON: Anat. Rec. 114:383, 1952.
- ROBISON, R.: The Significance of Phosphatase Esters in Metabolism. New York, University Press, 1932.
- ROSE, G.G.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 3:697, 1957.
- ROTH, H.: Schweiz. Med. Wschr. 80:1051, 1950.
Die Konservierung von Knochengewebe für Transplantation. Wien, Springer-Verlag, 1952.
- ROUILLER, C.: In: The Biochem. a. physiol. of Bone. Kap. V, S. 108, G. H. Bourne (ed.), London, Academic Press, 1956.
- ROYER, L.: Bull. soc. franc. min. 51:7, 1928.
- SCHAEFER, U.J.: Chem. Revs. 44:291, 1949.
- SCHINK, W.: Langenb. Arch. klin. Chir. 278:173, 1954.

- SCOTHORNE, R.J., J. Anat. 89:283, 1955.
I.A.McGREGOR:
- v. SEEMEN, H.: Dtsch. Z. Chir. 217:60, 1929.
- SELYE, H., Y. LEMIRE, Roux Arch. Entwicklungs. 151:572, 1960.
E. BAJUSZ:
- SEVERI, R.: Pathologica 25:611, 1933.
- SIEGRIST, W. H., J. Bone Jt. Surg. 42-A:539, 1960.
W. F. ENNEKING:
- SOBEL, A. E., M. BURGER: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87:7, 1954.
- SPEMANN, H., Arch. f. Mikr. Anat. u. Entwicklungs. 100:599, 1924.
H. MANGOLD:
- SPULER, A.: Anat. Anz. 16:13, 1899.
- STEARNS, M. L.: Am. J. Anat. 66:133, 1940.
Am. J. Anat. 67:55, 1940.
- STOLL, W. R., J. Am. Chem. Soc. 78:1585, 1956.
W. F. NEUMAN:
- SYLVEN, B.: Acta. Chir. Scand. 86:Suppl. 66, 1941.
- SYLVEN, B.: In: The Biochemistry and Physiology of bone. G. H. Bourne (ed.), Academic Press, Kap. III, S. 53, 1956.
- TEILUM, G.: Acta. Med. Scand. 123:126, 1946.
- TRUETA, J.: Rev. de Chir. 44:3, 1958.
- TURNBULL, D.: J. Chem. Phys. 18:198, 1950.
J. Chem. Phys. 20:411, 1952.
- UNNO, G.: Acta Pathol. Japonica 4:75, 1954.
- URIST, M. R., J. Bone Jt. Surg. 34-A:443, 1952.
F. C. McLEAN: J. Bone Jt. Surg. 43-A:7, 1961.
- VANAMEE, P., J. Exptl. Med. 94:255, 1951.
K. R. PORTER:
- WATSON, M. L., Am. J. Anat. 93:25, 1953.
R. A. ROBINSON:

- WATSON, M. L., Am. J. Anat. 95:109, 1954.
J. K. AVERY:
- WEIDENREICH, F.: In: Handbuch der mikroskop. Anat. d. Menschen. (v.
Möllendorff, Verf.), 2:391, 1930. Springer, Berlin.
- WEINBERG, H., J. Bone Jt. Surg. 41-A:151, 1959.
M. MAKIN, D. NELKEN,
J. GUREVITCH:
- WEISS, P.: Quart. Rev. Biol. 25:117, 1950.
- WEISS, P. A.: J. Embryol. Exper. Morphol. 1:181, 1953.
- ZETTERSTRÖM, R.: Biochem. Biophys. Acta 8:283, 1952.

Für die jederzeit gewährten Ratschläge danke ich Herrn

Dr. P. VITTALI.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Priv. Doz. Dr. H. HAMEL-MANN für die freundliche Übernahme der Arbeit.

Frau H. WETZSTEIN sei für die Anfertigung der histologischen Schnitte gedankt.

LEBENS LAUF

Am 3. November 1935 wurde ich als Sohn des Volksschullehrers Paul Mutzek und seiner Frau Franziska, geb. Brachner, in Fulda geboren. Von dort übersiedelte ich mit meiner Mutter in deren Heimatort Laaber bei Regensburg. Hier besuchte ich die Volksschule und anschließend das Neue Gymnasium zu Regensburg bis zur mittleren Reife. Das Abitur bestand ich im Sommer 1957 am Witeltsbacher Gymnasium zu München. Nach einsemestrigem Studium an der Pädagogischen Hochschule in Pasing immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1958 als Student der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich am 20. Februar 1964 die Ärztliche Prüfung ablegte.

